

KATALÁZ AKTIVITÁS VIZSGÁLATA A *RHIZOPUS* *ORYZAE* OPPORTUNISTA PATOGÉN JÁROMSPÓRÁS GOMBÁBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

LINKA BEÁTA

**TÉMAVEZETŐ:
DR. PAPP TAMÁS
EGYETEMI DOCENS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED
2012**

Dolgozatomat Édesapám emlékére ajánlom.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2. BEVEZETÉS	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. A <i>Rhizopus</i> nemzetség jellemzése	7
3.2. A járomspórás gombák, mint humánpatogén szervezetek	9
3.2.1. Az opportunista járomspórás gombafertőzések kialakulásának rizikófaktorai	10
3.2.2. A zigomikózisok patogenezise	11
3.3. A kataláz enzim	12
3.3.1. A kataláz géncsaládok kialakulása és csoportosítása	13
3.3.2. Hem katalázok	16
3.3.3. Nem hem katalázok	20
3.3.4. A katalázok, mint lehetséges virulenciafaktorok gombákban.....	20
3.4. Molekulamodellőzés szerepe és jelentősége	22
3.5. Állatkísérleti modellek	24
4. CÉLKITŰZÉSEK	28
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek	29
5.1.1. A kísérletek során alkalmazott gombatörzsek	29
5.1.2. A baktérium-transzformáció során alkalmazott törzsek.....	29
5.2. Az alkalmazott táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények	29
5.2.1. Az alkalmazott táptalajok és tápoldatok.....	29
5.2.2. Tenyésztési körülmények	30
5.3. Az alkalmazott pufferek, oldatok és reagensek	31
5.4. A kísérletek során használt indító szekvenciák	34
5.5. A kísérleti munka során összeállított transzformáló vektorok	35
5.6. Vizsgálati módszerek	36
5.6.1. Genomi DNS tisztítása	36
5.6.2. RNS tisztítás <i>R. oryzae</i> -ből.....	36
5.6.3. DNS gélelektroforézis	36
5.6.4. DNS izolálása agaróz gélből.....	37
5.6.5. PCR technikák	37
5.6.6. Génklónozás során alkalmazott módszerek.....	40
5.6.7. DNS szekvenciák meghatározása és elemzése.....	40
5.6.8. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítése.....	41
5.6.9. <i>E. coli</i> sejtek transzformációja	41
5.6.10. Protoplasztok készítése <i>R. oryzae</i> -ből.....	41
5.6.11. Gomba protoplasztok PEG-mediált integratív transzformációja	42
5.6.12. In vitro oxidatív stressz kísérletek	42
5.6.13. A spóra csírázás vizsgálata	43
5.6.14. Katalázok aktivitásának meghatározása	43

5.6.15. Izoenzim analízis	44
5.6.16. Állatkísérlet	45
5.6.17. A kataláz gének filogenetikai elemzése.....	46
5.6.18. A háromdimenziós szerkezet homológia-modellezése.....	46
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK	48
6.1. A <i>R. oryzae</i> oxidatív stresszel szembeni érzékenysége vizsgálatára különböző tenyésztési feltételek mellett, a gomba eltérő életállapotaiban	48
6.1.1. Hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz hatásának vizsgálata mikrotiter lemezen.....	48
6.1.2. Hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz hatásának vizsgálata táptalajon	51
6.1.3. A spóra csírázás vizsgálata	52
6.1.4. Katalázok aktivitásának meghatározása	53
6.2. A kataláz gének szekvencia - és filogenetikai elemzése	55
6.2.1. A <i>Rhizopus oryzae</i> kataláz gének filogenetikai kapcsolatainak vizsgálata	55
6.2.2. A <i>Rhizopus oryzae</i> kataláz gének szekvencia elemzése.....	57
6.3. A háromdimenziós szerkezet homológia-modellezése.....	60
6.4. A kataláz gének kifejeződésének vizsgálata	72
6.4.1 A transzkripció vizsgálata	72
6.4.2. Izoenzim analízis	76
6.5. Állatkísérletek	78
6.5.1. Immunszuppresszió, infekció	79
6.5.2. A mikózis lefolyása	80
6.5.2.1. Immunszuppresszált csoport <i>R. oryzae</i> uracil auxotróf törzsszel fertőzve.....	80
6.5.2.2. Immunszuppresszált csoport, <i>R. microsporus</i> törzsszel fertőzve.....	81
6.5.2.3. Nem-immunszuppresszált kontroll csoport, <i>R. oryzae</i> uracil auxotróf törzsszel fertőzve.....	81
6.5.2.4. Nem-immunszuppresszált abszolút kontroll csoport.....	81
6.5.3. A mikózis lefolyásának összefoglalása	82
6.5.4. A kísérleti állatok szerv-szuszpenzióinak vizsgálata YEG táptalajon.....	82
6.6. A kataláz kódoló gének delécijához szükséges transzformáló vektorok megszerkesztése	86
6.6.1. Transzformációs kísérletek.....	88
7. ÖSSZEFOGLALÁS	91
8. SUMMARY	94
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	97
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	109
11. MELLÉKLETEK.....	110

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CI	chlorophorm-isoamylalcohol (kloroform-izoamilalkohol)
CGD	Chronic granulomatous disease (krónikus granulomatózis)
DEPC	dietil-pirokarbonát
dNTP mix	deoxinukleotid trifoszfát mix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani tápközeg
MEA	Malt Extract Agar (malátakivonat agar)
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection, USA
OD	optikai denzitás
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	Polimerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
PEG	polietilén-glikol
PER	ammónium-perszulfát
PMC	PEG – szorbitol – MOPS – kalcium-klorid
PCI	phenol-chlorophorm-isoamylalcohol (fenol – kloroform – izoamilalkohol)
RPM	Revolutions Per Minute (percenkénti fordulatszám)
SMC	szorbitol – MOPS – kalcium-klorid
SO	szerkezet azonossági értékek
SZMC	Szeged Microbial Collection, University of Szeged, Hungary
TAE	trisz – ecetsav – dinátrium – EDTA
TCM	Tris – Calcium – Magnesium (trisz – kalcium – magnézium)
TEMED	tetrametil-etil-diamin
TRIS	Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
YEG	Yeast Extract – Glucose medium (élesztő kivonat- glükóz tápközeg)
YNB	Yeast Nitrogen Base (élesztő-nitrogénforrás)

YPG	Yeast Extract – Pepton – Glucose medium (élesztő kivonat – pepton – glükóz tápközeg)
-----	--

Az értekezésben előforduló fontosabb gének jelölései:*Aspergillus fumigatus*

<i>catA</i>	CatAp monofunkcionális, spóra specifikus kataláz
<i>cat1</i>	Cat1p micéliális kataláz
<i>cat2</i>	Cat2p bifunkcionális micéliális kataláz

Aspergillus nidulans

<i>catA</i>	CatA spóra specifikus kataláz
<i>catB</i>	CatB micéliális, stressz által indukált kataláz
<i>catC</i>	CatC állandóan kifejeződő, monofunkcionális kataláz
<i>catD</i>	CatD késői fázisban aktiválódó kataláz

Aspergillus niger

<i>catA</i>	CatA spóra specifikus kataláz
<i>catB</i>	CatB micéliális kataláz

Aspergillus oryzae

<i>catA</i>	CatA spóra specifikus kataláz
<i>catB</i>	CatB micéliális kataláz

Candida albicans

<i>cat1</i>	kataláz
-------------	---------

Mucor circinelloides:

<i>pyrG</i>	orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz
-------------	--------------------------------------

Rhizopus oryzae:

<i>cat1</i>	RO3G_9804.3	peroxisómális kataláz
<i>cat2</i>	RO3G_9026.3	kataláz
<i>cat3</i>	RO3G_9027.3	kataláz
<i>cat4</i>	RO3G_16995.3	kataláz

2. BEVEZETÉS

A járomspórás gombák többsége a *Mucorales* rend tagja, elsősorban növényi és állati eredetű bomló szerves anyagokon előforduló, talajból izolálható szaprofita szervezet. Ezek a gombák gyakran vizsgált modellszervezetek, különböző szabályozó mechanizmusok, sajátos szexuális folyamataik, vagy a morfogenezis tanulmányozása során. Jelentőségüket tovább növeli, hogy közöttük számos orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk. Orvosi szempontból egyes fajok, mint zigomikózist okozó opportunistá patogének érdemelnek figyelmet. A szervezet immunrendszerének csökkent működése a zigomikózisok döntő többségében bizonyított (GREENBERG és mtsi. 2004, SPELLBERG és mtsi. 2005). Ritkán egészséges immunrendszer mellett is előfordul megbetegedés, pl. tartós antibiotikum használat, illetve szöveti sérülés esetén. A zigomikózis kialakulásának kockázata elsősorban cukorbetegség (különösen az ezzel összefüggésben fellépő ketoacidózis), továbbá fertőzéshez, vagy orvosi beavatkozáshoz (pl. transzplantáció) kapcsolódó immunszuppresszió esetén nő meg. A járomspórás gombafertőzések, bár viszonylag ritkán fordulnak elő, de erősen progresszív és nehezen kezelhető jellegük miatt igen veszélyesek (GONZALEZ és mtsi. 2011, HEMASHEETAR és mtsi. 2011).

Annak ellenére, hogy a járomspórás gombák által okozott mikózisok esetszámban elmaradnak a *Candida* és az *Aspergillus* fajok által okozott megbetegedések mögött, figyelmet érdemel, hogy a zigomikózisok gyakorisága emelkedik, valamint e szervezetek sajátosan nagyfokú rezisztenciát mutatnak a legtöbb gombaellenes szerrel (pl. azolok) szemben. Zigomikózisok kialakulása esetén magas a mortalitási ráta (75-95%), a terápiás lehetőségek korlátozottak, ezért rendkívül fontos a járomspórás gombák által kiváltott fertőzésekben szerepet játszó virulencia faktorok genetikai hátterének feltárása, melyek új diagnosztikai és terápiás módszerek kidolgozását segíthetik elő (CSOMOR és mtsi. 2004, EINSELE és mtsi. 1997, EUCKER és mtsi. 2001, GHANNOUM 2000, RIBES és mtsi. 2000).

A zigomikózisok többségénél a betegség kialakulását a környezetben megtalálható sporangiospórák belélegzése teszi lehetővé. Az alsó és a felső légutak megbetegedését követően a fertőzés többnyire a központi idegrendszerre is áttér. A zigomikózisok közel harmadát-felét az ilyen, legtöbbször rhinocerebrális mikózis formában megnyilvánuló betegség teszi ki. A betegség rendkívül progresszív és amennyiben a fertőzés a szemideget is eléri, a központi idegrendszer érintettsége (a szemidegen keresztül terjedő kórokozóval) gyakorlatilag elkerülhetetlenné válik. A humán és állati mikózisok kialakulásáért felelős

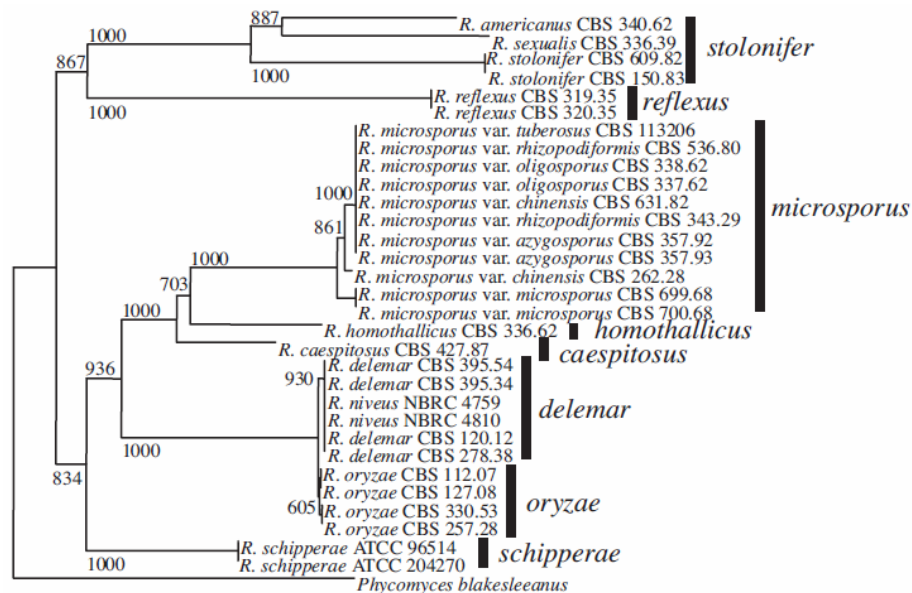
különböző mikroszkópikus gombák számos olyan biológiai sajátossággal rendelkeznek, amelyek a kórfolyamat kialakulásában szerepet játszanak. Mindez (és ez az opportunistá fertőzéseknél különösen hangsúlyos) a gazdaszervezet védekező rendszereivel kölcsönhatásban válthatja ki az adott megbetegedést. A járomspórás gombák esetében a gazdaszervezet oldaláról alapvetően két tényező járul hozzá a zigomikózis kockázatához: egyrészt a spóracsírázás gátlásának elmaradása, másrészt az intenzív növekedésnek indult micélium elleni védekező reakció elégtelensége. Egészséges szervezetben, az első fázisban a makrofágok fagocitózisa és a spórák oxidatív elpusztítása biztosítja a védelmet (ezen kívül, a spórák csírázását mérsékelten gátló hatással a normál szérum is rendelkezik). A védekezés második szakaszában a neutrofil granulociták szerepe a döntő, amelyek kemotaxis révén a növekvő gombafonalakhoz jutva és annak felszínén megtapadva, oxidatív citotoxikus folyamatok révén képesek a hifát károsítani, illetve fagocitózis nélkül is elpusztítani (EUCKER 2001, KOLOTLA és DIAMOND 1990). A korábban felsorolt fontosabb kockázati csoportokba tartozó betegeknél általában mindkét védekezési lépés elégtelen. Az invazív gombafertőzésekkel szembeni védekező mechanizmusok közt fontos szerepe van az oxidatív pusztító mechanizmusoknak. A fagociták által termelt oxidatív termékek egy irányított folyamatban elárasztják és elpusztítják a mikroorganizmusokat. A neutrofil sejtek által termelt hidrogén-peroxid hatékonyan pusztítja el a gomba hifákat, ugyanakkor ez a hatás katalázzal blokkolható (CHANG és mtsi. 1998). Mindezek alapján a mikrobiális kataláztermelést lehetséges virulencia faktornak gondolják, különösen olyan betegeknél, akiknél a neutrofil sejtek funkciója károsodott.

Jelen munka a *Rhizopus oryzae*, mely a zigomikózisokból leggyakrabban izolált gomba, katalázainak, illetve az ezeket kódoló gének jellemzésének megkezdését tűzte ki célul.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

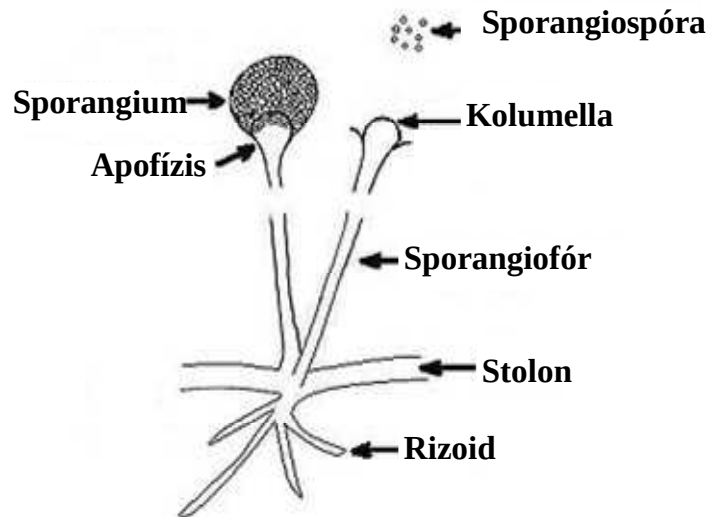
3.1. A *Rhizopus* nemzetség jellemzése

A *Rhizopus* nemzetséget korábban a *Mucoraceae* családba sorolták, később áthelyezték őket az *Absidiaceae* családba (ARX 1983), mely az egyik legnagyobb a *Mucorales* rendben. Morfológiai alapon Schipper három fajcsoportot (*R. stolonifer*-csoport, *R. oryzae*-csoport, *R. microsporus*-csoport) különböztetett meg a nemzetségen belül, és a fajcsoportokon belül öt fajba vonta össze az addig áttekinthetetlenül nagyszámú fajokat (SCHIPPER 1984). Később a DNS renaturációs kinetika vizsgálatok eredményei is támogatták ezt a felosztást (ELLIS 1985, 1986) azzal a különbséggel, hogy a *R. oryzae* helyett a *R. arrhizus* elnevezést használták. A RAPD-analízis a genetikai változékonyságot tárta fel *R. stolonifer* fajokon belül (VÁGVÖLGYI és mtsi. 2004). Ma már a molekuláris genetikai megközelítések általánosan használatosak a fonalgombák esetében is, és alapvetők a modern taxonómiában (BINDER és HIBBETT 2002, VOIGT és mtsi. 1999). A *Rhizopus*-csoportok közötti filogenetikai kapcsolatok meghatározását molekuláris taxonómiai vizsgálatokkal ABE és munkatársai (2010) végezték el (1. ábra).



1. ábra: A *Rhizopus* nemzetség jelenlegi felosztása (ABE és mtsi. 2010)

A nemzetségbe tartozó gombák jellegzetes morfológiai képletei a sporangiumtartók eredésénél található sztolonok és rizoidok, ezek megléte különbözteti meg őket a többi nemzetségtől. A sztolonok indaszerű léghifák melyek, ha érintkeznek a szubsztráttal sporangiumtartókat és azok eredésénél rizoidokat fejlesztenek (2. ábra).



2. ábra: A *Rhizopus* nemzetségbe tartozó gombák jellegzetes morfológiai képletei

Nem elágazó sporangiumtartóik egyértelműen megkülönböztetik ezeket a fajokat a *Thermomucor* és *Rhizomucor* nemzetségek tagjaitól. A sporangiumtartók magányosan vagy csoportosan fordulnak elő, sok spórás, terminális sporangiumot hoznak létre. A sporangiumok gömbszerűek, éretten szürkés-barnás színűek. Sporangiospóráik ellipszoid alakúak, szögletesek, soha nem gömbszerűek. A zigospórák szemölcsökkel vagy barázdákkal díszítettek. A micéliumon az oldalirányban növekedő zigofór kémiai indukció hatására találja meg a vele kompatibilis hifanyúlványt. A két gametangium közt a fúziós szeptum feloldásával lejátszódik a plazmogámia, amelyet a kariogámia követ. Az így kialakult zigosporangiumban jön létre a zigospóra. A fajok döntő többsége heterotallikus, de vannak homotallikus fajok is (pl. *R. sexualis*, *R. homothallicus*).

A *Rhizopus* nemzetség képviselői könnyen izolálhatók a természetből. Előfordulnak a talajban, bomló szerves szubsztrátokon, különböző élelmiszereken, gyümölcsökön. Számos raktári kártevő is található közöttük. Egyes termofil fajok (pl. az általunk vizsgált *Rhizopus oryzae*) opportunista invazív gombafertőzéseket okozhatnak. Növénykárosítóként a *R. stolonifer* szerepét tartják legmeghatározóbbnak. Az általa okozott lágyrothadást könnyű összetéveszteni a *Mucor* fajok által kiváltott tünetekkel (SMITH és mtsi. 1979, MICHAILIDES 1991). A *R. stolonifer* is képes egészséges gyümölcsöt fertőzni és gyümölcsrothadást kiváltani (CAMELE és mtsi. 2010). Jelentős veszteségeket okozhatnak a mezőgazdaságban, mivel számos másodlagos növénypatogén is található közöttük, amelyek növényi terményeket fertőzhetnek. A *R. microsporus* var. *oligosporus* és a *R. oryzae* megtalálható számos speciális fermentációval készülő távolkeleti étel starter

kultúrájában is (KIM és mtsi. 2010). A szója erjesztéséből származó tempelh előállításánál *R. oligosporus*-t használnak, Ázsiában és Afrikában *R. oryzae*-t alkalmaznak alkoholtartalmú italok előállításához (FENG és mtsi. 2006). Pár éve fedezték fel, hogy a *Rhizopus* törzsek gyakran hordoznak a micéliumon belül egy a *Burkholderia* nemzetségbe tartozó endoszimbionta baktériumot (PARTIDA-MARTINEZ és HERTWECK 2005). Később igazolták, hogy a már korábban ismert, a poliketid típusú rhizoxin és a hepatotoxikus rhizonin toxinokat nem a rizs penészesedését okozó gombák, hanem ez a baktérium termeli (PARTIDA-MARTINEZ és mtsi. 2007). Korábbi vizsgálatokban egy rhizonin-termelő törzs virulensebbnek bizonyult egerek fertőzésekor más, nem-termelő *Rhizopus* izolátumoknál (STEYN és mtsi. 1983, WILSON és mtsi. 1984). Erre épül CHAMILOS és mtsi. (2007) hipotézise, amely szerint a széleskörű antibakteriális droghasználat multidrog-rezisztens endoszimbionta baktériumokat hordozó járomspórás gombák kiszelektálódásához, illetve a járomspórás gombafertőzések számának növekedéséhez vezetett. Toxicitást más törzsek esetében is detektáltak, de a feltételezett mikotoxinokat nem azonosították (RABIE és mtsi. 1985). *Rhizopus* nemzetség tagjait fakultatív humánpatogén kórokozókként is nyilvántartják. Az általában súlyos kimenetelű, elsősorban károsodott, vagy legyengített immunrendszerű betegeket érintő zigomikózisok leggyakoribb kórokozóiként tartják őket számon.

3.2. A járomspórás gombák, mint humánpatogén szervezetek

A mostanáig megismert több mint hetvenezer gombafaj közül viszonylag kevés azoknak a száma, melyek képesek emberben fertőzést okozni. Az elmúlt évtizedekben jelentősen megnőtt, és napjainkban is növekvő tendenciát mutat az opportunist gombafertőzések esetszáma (CHAYAKULKEEREE és mtsi. 2006). Az emberi megbetegedéseket okozó mikroszkópikus gombák nagy része ún. opportunist kórokozó, tehát csak bizonyos hajlamosító tényezők hatására képes betegséget okozni (ESPINEL-INGROFF és mtsi. 1987). Az egészséges szervezet természetes immunitással rendelkezik ilyen gombafertőzések ellen. A fertőzés, illetve egyéb okok miatt kialakuló immundeficiens állapot és a mesterséges immunszuppresszió az opportunist gombainfekciók legnagyobb rizikófaktora. Az opportunist gombafertőzésekben a *Candida* és *Aspergillus* fajok dominálnak, de az utóbbi évtizedben növekvő gyakorisággal írtak le egyéb gombák által okozott fertőzéseket is, többek között a járomspórás gombák által okozott mikózisokat (RODEN és mtsi. 2005, WALSH és GROLL 1999). A járomspórás gombák által okozott fertőzéseket összefoglaló néven zigomikózisoknak nevezzük, melyek

beteg, legyengült-, vagy immunszupresszált szervezetben heves lefolyásúak, és akár halálos kimenetelűek is lehetnek (AL-ASIRI és mtsi. 1996, CARR és mtsi. 1999, MALLIS és mtsi. 2010). A Mucoromycotina altörzsön belül humán megbetegedésekkel a következő fajokat hozták leggyakrabban kapcsolatba: *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Cokeromyces recurvatus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Rhizomucor pusillus*, *R. microsporus* var. *rhizopodiformis*, *R. oryzae*, *Saksanea vasiformis*, és *Syncephalastrum racemosum* (FREIFELD és IWEN 2004). Az esetszámat tekintve mind közül kiemelkedik a *R. oryzae* a *Rhizopus* nemzetség más termotoleráns képviselőivel együtt (CHAYAKULKEEREE és mtsi. 2006, RIBES és mtsi. 2000).

3.2.1. Az opportunista járomspórás gombafertőzések kialakulásának rizikófaktorai

A járomspórás gombák spórái egészséges immunrendszerű emberekben általában nem képesek fertőzéseket kialakítani. A spórák aktiválják az immunrendszert, mely megakadályozza a spóra csírázását. Napjainkra elsősorban a fejlett orvosi technikák (pl. csontvelő- és szervátültetés, kemoterápia, szteroid kezelés) hatására többszörösére emelkedett az immunszupresszált betegek száma, így az opportunista gombainfekciók számának növekedése a fertőzésekre fogékony immunszupresszált betegek számával párhuzamosan növekszik (EUCKER és mtsi. 2001, HAGENSEE és mtsi. 1994, MALLIS és mtsi. 2010, MAERTENS és mtsi. 1999, SINGH 2001, TOBON és mtsi. 2003).

A zigomikózisok kialakulásában a gazdaszervezet szempontjából két tényező nagyon jelentős: első és legfontosabb a spóracsírázás gátlásának elmaradása, majd ezt követően, az intenzív növekedésnek induló micélium elleni védekező reakció nem megfelelő működése (RIBES és mtsi. 2000). Egészséges szervezetben az alveoláris makrofágok és a neutrofil sejtek meggátolják a mikózisok kialakulását (BRAKHAGE és mtsi. 2010, HASENBERG és mtsi. 2011). Az elsődleges védelmet a makrofágok biztosítják a szervezetbe jutott csírázó spórák fagocitózisa és oxidatív elpusztítása által. A normál szérum is rendelkezik a spórák csírázását gátló hatással, azonban cukorbetegség esetén ez a védelem is gyengébb (NIRMALA és mtsi. 2011, RIBES és mtsi. 2000). Egészséges szervezetben a védekezés második szakaszában a neutrofil sejtek játszanak kulcsszerepet. A növekvő gombafonalakhoz kemotaxis által jutnak el, azok felszínén megtapadva oxidatív citotoxikus folyamatokat indítanak, ezzel károsítják a hifákat. Ketoacidózis és neutropénia állapotában a kemotaxis, fagocitózis és az oxidatív károsító folyamatok gátoltak (BUTLER és mtsi. 2005). Ez a rendszer azonban a nyugvó spórákat nem képes megsemmisíteni. A csökkent immunitású betegek esetén általában mindkét védekezési

reakció elégtelen. A makrofágok funkcióvesztése vagy pusztulása következtében a spórák csírázása megindul, a neutrofil sejtek nem megfelelő működése miatt a gomba micélium invazív növekedése kezdődik, így a gomba a mélyebb szöveti rétegekbe is el tud jutni (EUCKER és mtsi. 2001, KOLOTLA és DIAMOND 1990). A glükokortikoid kezelés átmenetileg alacsonyabb szintű B-sejt számot eredményez, és csökkenti az immunglobulin termelődést, valamint a neutrofil granulociták működését (neutropénia igen jelentős rizikófaktor a zigomikózisok kialakulása szempontjából). Az intravénás gyógyszerek helytelen adagolása további hajlamosító tényező. Az AIDS-es betegeknél is jelentkezik járomspórás gombák által kiváltott infekció. A HIV-fertőzött páciensekben több oka lehet a zigomikózis kialakulásának (NICHOLS és mtsi. 2011, VAN DEN SAFFELE és BOELAERT 1996). Cukorbetegségeknél jelentkező ketoacidózis szintén kockázatot jelent, az acidózis következtében csökken a transferrin vaskötő képessége, ami magas vaskoncentráció kialakulásához vezet (GIULIANI és mtsi. 2010). A hematológiai megbetegedéseknél gyakori vörösvértest transzfúzió során, a szérumban emelkedő vaskoncentráció figyelhető meg (AL AKHRASS és mtsi. 2011, IBRAHIM 2011, GONZALEZ és mtsi. 1997). A fellépő vas többlet szintén rizikófaktor lehet a zigomikózis patogenezisében (SPELLBERG és mtsi. 2012). Az autoimmun betegségek, illetve súlyos égési sérülések ugyancsak növelhetik a zigomikózis kialakulásának esélyét (ARCE és PÉREZ 2010). A hosszantartó kemoterápiás kezelések, a széles spektrumú antibiotikumok használata, az antimikrobiális profilaxis szintén növeli a zigomikózisok kialakulásának kockázatát (MATHUR és mtsi. 1999, SMITHERMAN és PEACOCK 1995).

3.2.2. A zigomikózisok patogenezise

Néhány járomspórás gomba termotoleráns szervezet, így az emberi testhőmérséklet optimális a gyors növekedésükhöz. A zigomikózisok többségének hátterében a sporangiospórák belélegzése révén kialakuló rhinocerebrális infekció áll. A gyors és agresszív lefolyású rhinocerebrális zigomikózis az ornyálkahártya fertőződésével kezdődik, de a gyorsan növekvő hifák később a látóideget és a központi idegrendszert is károsíthatják (PETERSON és mtsi. 1997, RANGEL-GUERRA és mtsi. 1996). A belélegzett spórák lerakódhatnak a felső légutakban és a paranazális szinuszokban (FERGUSON 2000). Megfelelő immunválasz hiányában a sporangiospórák ornyálkahártyán való megtapadását gyors spóracsírázás követi, majd a gomba fonalas növekedése indul el, amely során felemészti a környezetében lévő szövetállományt. A felső légutakból a fertőzés gyorsan továbbterjedhet a környező szövetekre. Gyakori az arcüregek fertőzése, amely rövid idő

alatt tovább terjed az arcszövetekre, az orr és a száypad területére. Olykor áttérjedhet a fertőzés a szemekre, ahonnan tovább halad a központi idegrendszer területére is (EUCKER és mtsi. 2000, RIBES és mtsi. 2000). Gyakori megbetegedések között kell említeni a tüdő megbetegedését is, amit gyakran összetévesztenek az *Aspergillus* okozta fertőzéssel vagy bakteriális pneumóniával (LANTERNIER és mtsi. 2012, REYES és mtsi. 2008, TEDDER és mtsi. 1994, WALSH és mtsi. 2012). Extrém alultáplált betegeknél, elsősorban gyermekeknél, fordul elő a tápcsatorna fertőződése (REIMUND és RAMOS 1994, ZAVASKY és mtsi. 1999). Kisebb mértékben fordul elő elsődleges mikózis bőr és szöveti sérülésekben, égési sérülésben, sérült implantációban, intravénás katéterek alkalmazása során (ADAM és mtsi. 1994, FINGEROTH és mtsi. 1994). Amennyiben a fertőzés eléri a véredényeket, azok inváziója által a szervezet más pontjaira is áttérjedhet (pl. szív, vese, máj, agy) vérzést, trombózist, infarktust és szövetnekrózist eredményezhet (EUCKER és mtsi. 2000, INGHAM és mtsi. 2010, MATHUR és mtsi. 1999, PAGANO és mtsi. 1997).

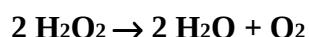
A zigomikózisok jelentőségét növeli, hogy kialakulásuk esetén a terápiás lehetőségek meglehetősen korlátozottak és igen magas az ilyen típusú fertőzések halálozási aránya. Ez részben e fajok gyors, a normál testhőmérsékleten optimális feltételeket találó növekedésével, másrészt a gombaellenes hatóanyagok többségével szemben mutatott nagyfokú rezisztenciájával magyarázható. Ennek tudható be, hogy RODEN és mtsi. (2005) felmérése szerint, a rhinocerebrális zigomikózisban megbetegedettek esetében a mortalitás elérte a 97%-ot, amely értéket nagy dózisu amfotericin B kezelés alkalmazásával is csak 49%-ra lehetett csökkenteni.

3.3. A kataláz enzim

A katalázok (EC 1.11.1.6., hidrogén-peroxid oxidoreduktáz) a metalloenzimek egyik leggyakoribb csoportja. Széles körben elterjedtek az élővilágban. Az aerob baktériumoktól kezdve a magasabb rendű növényekig és állatokig minden élőlényben megtalálhatók. Feladatuk a hidrogén-peroxid lebontása oxigénné és vízzé. THÉNARD már az 1811-es vizsgálataiban arra a következtetésre jutott, hogy létezik egy olyan anyag, amely a hidrogén-peroxidot, mint sejthalált okozó vegyületet semlegesíteni képes az élő szervezeten belül. Ezt az anyagot 1901-ben LOEW kataláznak nevezte el, utalva a hidrogén-peroxid katalitikus bontására.

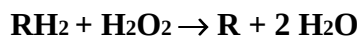
A katalázok a hidrogén-peroxid dizmutációval történő közömbösítését végzik. A hidrogén-peroxid koncentrációtól függően a kataláz enzimnek kétféle lehetséges működése van (DEISSEROTH és DOUNCE 1970). Magas hidrogén-peroxid koncentráció mellett egy

gyorsabb, ún. katalitikus módon működik (PASSARDI és mtsi. 2007b). Az első hidrogén-peroxid molekulával képezi az első enzim-szubsztrát komplexet, majd a második hidrogén-peroxid molekulával képezi a második enzim-szubsztrát komplexet. Ebben az esetben a donor és az akceptor szerepét is a hidrogén-peroxid tölti be, így a kataláz egyszerre két molekula hidrogén-peroxidot képes közömbösíteni, és ehhez nem igényel redukáló erőt (SCHONBAUM és mtsi. 1982). Ebből a reakcióból két termék keletkezik, az O_2 és a H_2O , majd az enzim újra aktív formává válik (HARA és mtsi. 2007). A kataláz enzim így a következő reakciót katalizálja:



Nagy hidrogén-peroxid-koncentráció esetén egy katalázmolekula egy perc alatt több mint egymillió szubsztrátot bont. Az enzimatis reakció sebessége csak akkor ilyen nagy, ha a hidrogén-peroxid koncentrációja a toxikus értékhez közeli.

Ezzel szemben alacsony hidrogén-peroxid-koncentráció esetén az enzim affinitása a szubsztráthoz nagyon kicsi. Ennél a koncentrációnál ($<10^{-6}$ M), az ún. peroxidatikus út működik, ahol különböző vegyületek (etanol, aszkorbát, RH_2) tölthetik be a hidrogén-donor szerepét az alábbi reakció szerint (PASSARDI és mtsi. 2007b):



3.3.1. A kataláz géncsaládok kialakulása és csoportosítása

Az élőlények energiatermelő folyamataiban túlnyomórészt oxidatív folyamatok vesznek részt. Ennek következtében az evolúció folyamán, egyre fejlettebb detoxifikációs rendszerek alakultak ki, amelyek az ilyen folyamatok során képződő reaktív oxigén molekulákat semlegesíteni tudják.

fotoszintézist folytató, és a fotoszintetikus folyamatok melléktermékeként molekuláris oxigént termelő szervezetekként. A termelt oxigén hatására a légkör oxidatívvá vált és a kialakult aerob légzés szükségessé tette olyan rendszerek kialakulását, amelyek védelmet biztosítanak az aerob szervezetek számára a képződő reaktív oxigén gyökökkel (ROS) szemben. A cianobaktériumok nemcsak az ősi oxigén termelés szempontjából voltak fontosak, ők voltak az első olyan organizmusok is, amelyekben az oxidatív légkör károsító hatásait kivédő elektron-transzport rendszerek jöttek létre (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>), kulcsszerepet játszva az evolúció folyamán az oxidatív légkör által határolt életterek meghódításában. A cianobaktériumok ezzel jelentős

szerepet töltöttek be a geológiai és biológiai evolúcióban, teret nyitva az aerob és oxigén tartalmú bioszféra világának (BERNROITNER és mtsi. 2009).

Ennek megalapozása jelen tudásunk szerint a cianobaktériumokhoz köthető, amelyek a többi prokariótához hasonlóan, a Föld legősibb szervezetei közé tartoznak. Mintegy 3,5 milliárd évvel ezelőtt alakultak ki az első legprimitívebb növény-típusú

Jelentőségükre tekintettel a cianobaktériumok körében 44 törzs kataláz és peroxidáz genomszekvenciáját elemezték. Ezen gének vizsgálata során megállapították, hogy az ősi genomban az oxidatív légkör kialakulásának idején számos olyan géncsalád alakult ki, amely képes a külső vagy belső környezet folyamatai által létrejött oxidatív molekulák lebontására (BERNROITNER és mtsi. 2009).

A kataláz géncsaládok csoportosítása:

Hem katalázok:

1. A hem tartalmú monofunkcionális katalázok:

- monofunkcionális katalázok (minden élőlény csoportban megtalálhatóak) (ZAMOCKY és mtsi. 2008a)
- hem peroxidáz szupercsalád (megtalálhatók növényekben, gombákban, protistákban és archeákban) (PASSARDI és mtsi. 2007b, WELINDER 1992)
- peroxidáz- ciklooxigenáz szupercsalád (minden élőlény csoportban megtalálhatóak) (ZAMOCKY és mtsi. 2008b)

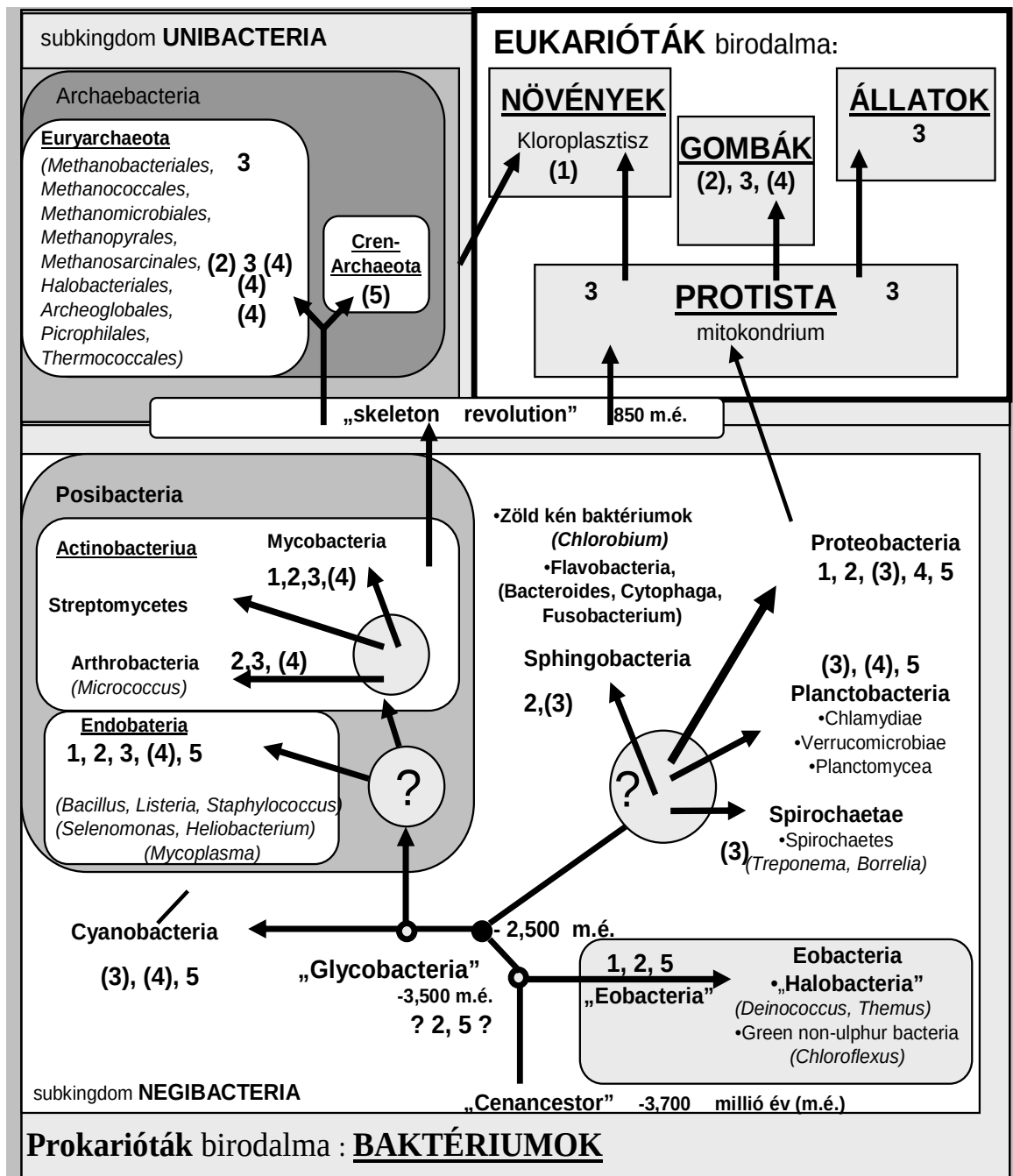
2. Bifunkcionális kataláz-peroxidázok (KatGs) (baktériumokban és gombákban fordulnak elő).

Nem-hem katalázok:

3. A nem-hem monofunkcionális katalázok:

- Mangán-katalázok (MnCat) (csak baktériumokban fordulnak elő) (ZAMOCKY és mtsi. 2008a)
- Vanádium peroxidázok (LITTLECHILD 1999)
- Tiol peroxidázok (ROUHIÉ és JACQUOT 2005)

A hem tartalmú monofunkcionális katalázok I., II. és III. típusát (KLOTZ ÉS LOEWEN 2003), a hem tartalmú bifunkcionális kataláz-peroxidázok és a nem-hem tartalmú monofunkcionális katalázok leszármazási viszonyait a 3. ábra mutatja be.



3. ábra: A katalázok eloszlása a CAVALIER-SMITH (2002a, 2002b) által

javasolt rendszertani csoportokban (KLOTZ ÉS LOEWEN 2003).

Monofunkcionális katalázok a kataláz életrán: az I. típusú katalázok 1-es, II. típusú katalázok 2-es, a III. típusú katalázok 3-as számmal vannak jelölve. A kataláz-peroxidázok (CPX) eloszlását a 4-es szám jelzi. A nem-hem (Mn) katalázok előfordulását az 5-ös szám mutatja. A zárójelben levő számok a nagy valószínűséggel lezajlott, laterális géntranszfereket jelzik.

3.3.2. Hem katalázok

3.3.2.1. A monofunkcionális katalázok

A monofunkcionális vagy más néven „valódi” katalázok alkotják a legnagyobb csoportot a kataláz géncsaládok közül. Ezen a csoporton belül két alcsoportot különítenek el: a kis és a nagy alegységből álló katalázokat. A kis alegység katalázok további két csoportra oszlanak: az 55-69 kDa és a 43-75 kDa méretű enzimekére. A nagy alegység katalázok a 75-84 kDa méret tartományba esnek. A kis alegység katalázoknál a C-terminális rész csonkolódása következett be, aktív centrumukban hem *b* és esetenként egy második redox aktivitású NADPH kofaktor található. A nagy alegység katalázoknál génfúziós eseményeket követő, génszakasz vesztéssel járó folyamatok zajlottak le, aktív centrumukban hem *d* található (KLOTZ és LOEWEN 2003). Az rendelkezésre álló monofunkcionális kataláz fehérjék szekvenciájának vizsgálatával az enzim aktív centrumában, a hem molekula körül hét erősen konzervált pozíciójú aminosav jelenlétét határozták meg. A hem molekula disztális oldalán öt (His, Ser, Val, Asn és Phe) a proximális oldalán két (Tyr, Arg) konzervált pozíciójú aminosav található. Ezen eredmények alapján megállapították, hogy a monofunkcionális kataláz fehérjék aktív centrumának szerkezete az evolúció folyamán rendkívül konzervált maradt. A katalázok egy kisebb csoportjában, a nagy alegység katalázokban, a C-terminális részen egy extra domén található, mely egy flavodoxinszerű szakasz (ZAMOCKY and KOLLER 1999).

A enzimatikusan aktív monofunkcionális katalázok általában homotetramerek, minden alegység egy hem csoportot tartalmaz. Ritkán előfordul dimer, hexamer és heterotrimer formában aktív szerkezet is. A hem tartalmú enzimek általában erős kataláz és csekély peroxidáz aktivitással rendelkeznek. A molekula aktív centrumához egy csatornarendszeren keresztül jut a hidrogén-peroxid. A kataláz molekula felszínén ez a csatorna 17 Å átmérőjű, melyet 4,5-5,5 Å méretű „fedél” zár. Az aktív centrum felé haladva a csatorna 5 Å átmérőjűre szűkül, hossza 25-30 Å (GOUET és mtsi. 1995).

A monofunkcionális hem kataláz gének elkülönülése a többi kataláz géntől a katalázok evolúciós fejlődésének korai szakaszára tehető. Ebben a fejlődési szakaszban legalább két génduplikációt követő génfúziós esemény is lezajlott (ZAMOCKY és mtsi. 2008a).

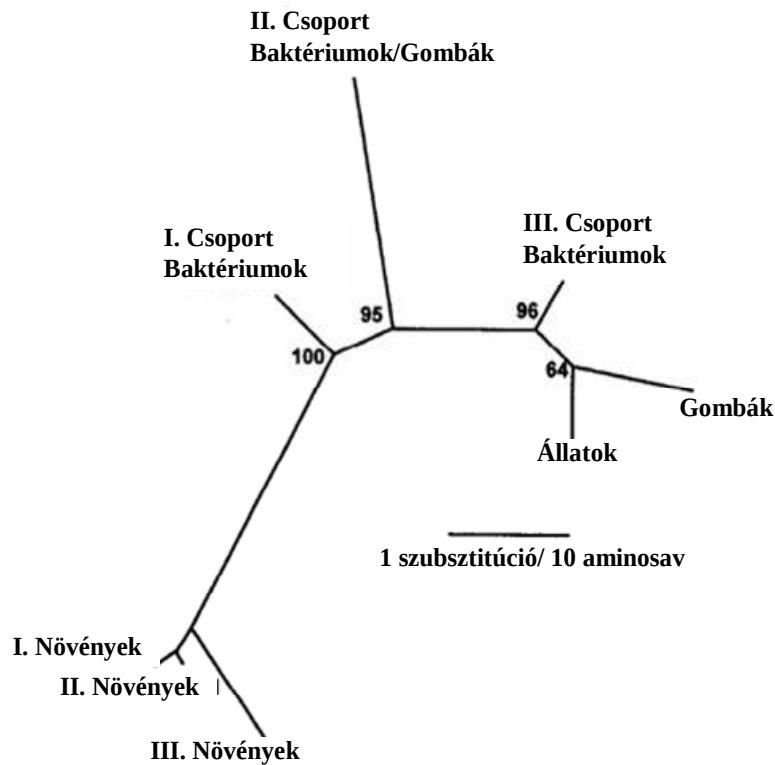
Klotz és munkatársai megvizsgálták a prokarióta és eukarióta hem monofunkcionális katalázok filogenetikai kapcsolatait (KLOTZ és mtsi. 1997, KLOTZ és LOEWEN 2003). Az általuk készített törzsfát a 4. ábra szemlélteti; a nem gyökereztetett törzsfán az ágak hossza az evolúciós távolságot tükrözi.

Elemzéseik alapján a kataláz gének három csoportban különültek el. Az I. csoportba bakteriális és növényi kataláz gének tartoznak. A II. csoportban baktériumok és gombák kataláz génjei találhatók, míg a III. csoportot baktériumok, állatok és gombák kataláz génjei alkotják. A növényi és állati eredetű kataláz gének egy csoportban, a gomba kataláz gének két csoportban és a bakteriális kataláz gének mind a három csoportban megtalálhatók.

A katalázok evolúciója során legalább két olyan génduplikációs esemény zajlott le, amelynek következtében kialakult a ma ismert három monofunkcionális kataláz géncsalád. A bakteriális kataláz géneket mind a három ágon megtaláljuk. Az I. és III. csoportban a prokarióta kis alegység kataláz gének helyezkednek el, míg a II. csoportban a baktérium és gomba nagy alegység kataláz gének fordulnak elő. A kis alegység katalázok két alcsoportja a filogenetikai törzsfán élesen elhatárolódva egymástól az I. és III. csoportban foglalnak helyet. Az I. csoportba baktérium, alga és növény kis alegység kataláz gének tartoznak, míg a III. csoportban főleg proteobaktérium, protista, gomba és állati eredetű gének találhatók (KLOTZ és mtsi. 1997). Ebben a csoportban találhatók a tudományos és orvosi szempontból is sokat vizsgált szarvasmarha máj katalázok és az emberi vörösvérsejt katalázok. A II. csoportba baktérium és gomba nagy alegység kataláz fehérjék tartoznak, melyek alaposabb vizsgálatát követően megállapították, hogy rokonágukért horizontális géntranszfer felelős. Az ebbe a csoportba tartozó fehérjék hem *d* prosztetikus csoportot hordoznak. A nagy alegység katalázokat kódoló gének áramlása különböző baktérium fajok között, valamint baktérium és gomba fajok között történhetett. Az, hogy a génátvitel egyirányú volt a baktériumokból gombákba vagy akár a mindkét irányban is végbemehetett, nem tisztázott (MAYFIELD és DUVAL 1996).

Jelentős különbség mutatkozik a növényi és állati kis alegység katalázok között, melyek két külön csoportban az I. és a III. csoportban helyezkednek el. Gomba katalázok két csoportban is megjelennek: a III. csoportban közel az állati eredetű kis alegység kataláz ághoz, valamint a II. csoportban a baktériumok nagy alegység ágon foglalnak helyet (4. ábra).

A II. csoportban található nagyalegység kataláz gének által kódolt fehérjék tömege 80 kDa körül van, míg az I. és III. csoportban található génekről átíródó fehérjék 43-75 kDa között mozognak. A II. csoportba tartozó gomba és bakteriális katalázok kinetikai sajátosságait nagy intenzitással vizsgálják, kristály szerkezetük jellemzésével fizikai megjelenésüket azonosítják.



4. ábra: Klotz és munkatársai által létrehozott prokarióta és eukarióta monofunkcionális kataláz gének rokonságát meghatározó nem gyökereztetett filogenetikai törzsfa (KLOTZ és mtsi. 1997).

Nagyszámú nagy alegység kataláz gén szekvenciáját hasonlították össze választ keresve a kis és nagy alegység katalázok kialakulásának folyamataira. A gének többségénél azt találták, hogy a C-terminális domén szekvenciája kicsit nagyobb, mint az N-terminális domén szekvenciájának kétszerese. Az így kapott adatokból nem tudták megállapítani, hogy a C-terminális domén egy szimpla addíciós esemény következtében alakult így, vagy az N-terminális domén csonkolódott. E vizsgálatok alapján nem lehet megmondani, hogy az evolúció milyen irányba zajlott: a kis alegység katalázoktól a nagy alegység katalázokig, vagy a nagy alegység katalázoktól a kis alegység katalázokig. De a nagyon egyszerű szerkezeti különbségek az egyes csoportok között azt sugallják, hogy bármelyik útvonal megvalósulhatott a fejlődés folyamán, amely magába foglalja a gén fúziós vagy deléciós eseményeket, melyeknek következtében szekvencia hozzáadás vagy szekvencia veszteség jöhetett létre.

A nagy alegység katalázok kiterjedt szekvenciái, nagymértékben stabilizálják a kataláz fehérje belső szerkezetét. Ennek eredményeképpen az enzim akár 70 °C-on is aktív maradhat és detergenssekkel szemben is viszonylag ellenálló. Az organizmusokban a nagy alegység enzimek a környezeti stressz hatások kivédésében töltenek be jelentős szerepet,

ezt a védő funkciót kísérletesen bizonyították *E. coli* esetében a KatE fehérje vizsgálatakor (LOEWEN és mtsi. 1985).

A II. csoportba tartozó nagy alegység kataláz fehérjéknek feltűnő sajátossága, hogy a gént alkotó domének eltérő evolúciós útvonalból származnak a többi monofunkcionális katalázhoz viszonyítva. A nagy alegység kataláz domének származását, két mechanizmus lezajlásával magyarázzák: az endoszimbionta elmélettel és horizontális gén transzferrel.

Az eukarióta katalázok többsége membránnal határolt sejtorganelumban, a peroxiszómában foglal helyet (SUBRAMANI 1993). A peroxiszómális katalázokon egy szignál peptid található, úgynevezett apokataláz alegység, amelynek irányításával a citoplazmából a peroxiszómához szállítódnak a fehérje monomerek, majd a peroxiszóma belsejébe egy receptor által közvetített folyamat révén kerülnek. A peroxiszómában hem prosztetikus csoport kapcsolódik a kataláz monomerekhez, majd tetramer formává szerelődnek össze, ezáltal válnak funkcióképes fehérjévé.

A különböző géncsaládokba tartozó kataláz gének kinetikai és fizikai tulajdonságai eltérőek, ezek az eltérő tulajdonságok szelekciós előnyhöz juttathatták a különböző élőhelyeken előforduló élőlény csoportokat. Az egyértelmű, hogy különböző katalitikus aktivitással rendelkeznek a nagy és a kis alegység enzimek. A III. csoportba tartó bakteriális kis alegység kataláz gének általában intracelluláris kórokozókban fordulnak elő és az intracelluláris oxidatív stressz kivédésében játszanak szerepet, ezáltal szelektív előnyökhöz juttatják a mikrobát. Az I. csoportban helyet foglaló kis alegység kataláz gének főleg talajlakó baktériumokban fordulnak elő (KLOTZ és mtsi. 1997). Az viszont tisztázatlan, hogy milyen működésbeli különbségek vannak az I. és III. csoportba tartozó kis alegység katalázok között és mi a szerepük ezeknek a működésbeli különbségeknek.

3.3.2.2. A bifunkcionális kataláz-peroxidázok (KatG)

A bifunkcionális kataláz-peroxidázok (KatG) kataláz és peroxidáz aktivitással is rendelkeznek. Az algákra, protistákra és gombákra jellemző az előfordulásuk. Túlnyomórészt ezekben a fehérjékben is megtalálható a hem *b*. Dimer vagy tetramer formában aktívak. Két hasonló felépítésű, N- és C-terminális doménből állnak. Az N-terminális domén megőrizte aktivitását, a C-terminális domén viszont inaktív formában van jelen. A génduplikációs események során az eredeti C-terminális domén megkettőződött, hiányzik belőle a prosztetikus csoport (WELINDER 1991, 1992), önálló funkciót nem lát el, viszont részt vesz az aktív centrum felépítésében (BAKER és mtsi.

2004). A KatG fehérjék háromdimenziós szerkezetének vizsgálatakor, megállapították, hogy a C terminális domén szerkezetére három nagy hurok jellemző, ezek közül kettő erősen konzervált szekvenciával rendelkezik (ZAMOCKY és mtsi. 2001). A C-terminális doménben található hurkok, összeszorítják a hidrogén-peroxid befogadó csatornát a hem *b* prosztetikus csoport disztális oldalán, így az aktív centrumhoz vezető csatorna tölcsér alakot vesz fel.

A cianobaktériumok bifunkcionális kataláza az evolúció korai szakaszában szegregálódott a többi kataláz géntől. Legalább két független laterális gén transzfer zajlott le ezen a fehérjecsaládon belül. Az eukariótákban két egymástól független evolúciós útvonal eredményeként jöttek létre a *KatG* gének: egy az algákban és egy a gombákban. Nagy valószínűséggel mindkét esetben a laterális gén transzfer a baktériumok és az eukarióták szoros együttélésének következménye volt (ZAMOCKY és mtsi. 2008a).

3.3.3. Nem hem katalázok

A nem-hem monofunkcionális katalázok csoportjában foglalnak helyet a di-mangán vagy régi nevükön pszeudo-katalázok, egy kis géncsaládot alkotva. Az összes ismert di-mangán fehérje szekvenciát megvizsgálva, a nem-hem kataláz géncsaládot, három alcsaládra osztották fel: mangán-katalázok, (MnCat) vanádium peroxidázok és tiol peroxidázok (PASSARDI és mtsi. 2007a). E fehérjék hat azonos alegységből állnak (30 kDa), minden alegység központjában egy binukleáris mangán híd található, melyet négy hélixből álló komplex fog körbe. Az aktív centrum ebben a molekulacsoportban is konzervált, minden mangán iont egy hisztidin és egy glutamin fog közre. Egy központi csatornarendszer halad végig a hexamer molekulán, elágazva az egyes monomerek irányába, minden di-mangán aktív centrum irányába (WHITTAKER és mtsi. 2003). Ezek a csatornák erőteljes hasonlóságot mutatnak a monofunkcionális és a kataláz-peroxidáz katalázok csatorna szerkezetével. Ezen enzimek hidrogén-peroxid semlegesítő aktivitása jóval kisebb a monofunkcionális hem katalázokéhoz képest, valószínűleg ez az oka, hogy nem terjedtek el széles körben, az élővilágban. Főleg nitrogénfixáló organizmusokban található meg (ZAMOCKY és mtsi. 2008a).

3.3.4. A katalázok, mint lehetséges virulenciafaktorok gombákban

Az invazív gombafertőzésekkel szembeni védekező mechanizmusok között fontos szerepe van az oxidatív ölü sejteknek. A fagociták által termelt oxidatív termékek egy irányított folyamatban elárasztják és elpusztítják a mikroorganizmusokat. A neutrofil sejtek

által termelt hidrogén-peroxid hatékonyan pusztítja el a gomba hifákat, ugyan ez a hatás katalázal blokkolható (CHANG és mtsi. 1998). Mindezek alapján a mikrobiális kataláztermelést lehetséges virulenciafaktornak gondolják. Például, a krónikus granulomatózis (CGD), – ritka öröklődő rendellenesség – melyre jellemző a fagociták szuperoxid és hidrogén-peroxid termelő képességének hiánya a NADPH oxidációjának defektusa következtében (DIAMOND és CLARK. 1982). Az ilyen betegségben szenvedő emberekből hiányzik ez az antimikrobiális mechanizmus, ezáltal nagyon érzékenyek a baktérium és gomba fertőzésekkel szemben.

A katalázoknak az opportunist gombafertőzések kialakulásában betöltött szerepét *Aspergillus fumigatus* és *Candida albicans* esetében vizsgálták részletesebben. Az *Aspergillus* fertőzés az egyik fő megbetegítő és halálhoz vezető tényező CGD betegeknél. CGD egér modellben az *A. fumigatus* tracheába kerülése nagyfokú mortalitással jár, míg a vad típusú egerekben nem okoz betegséget. Ez a felfedezés alátámasztja a fagociták által termelt reaktív oxigénfészeségek fontosságát a gazda *A. fumigatus*-szal szembeni védekezőképessége szempontjából (CHANG és mtsi. 1998).

A. fumigatus-ban három aktív katalázt azonosítottak: CatAp, Cat1p és Cat2p. A CatAp monofunkcionális kataláz, mely di- és tetramer formában van jelen. Jellemző rá, hogy ellenáll a hő, a fém ionok és a detergenssek hatásának. Nagy hasonlóságot mutat az *A. niger* CatA és az *Escherichia coli* HP11 katalázal. Csak a csírázó konídiumokban termelődik. *CatA*⁻ mutánsok ugyanolyan fertőzőképesnek bizonyultak állatkísérletekben, mint a vad típus, jelezve, hogy a CatAp valószínűleg nem tekinthető virulenciafaktornak (CHANG és mtsi. 1998). A Cat1p és Cat2p fehérje a micéliumban található meg. A Cat2p bifunkcionális kataláz-peroxidáz, monomer formát mutat, érzékeny a hő, fémionok és a detergenssek hatásának (PARIS és mtsi. 2003). A monomer forma meglepő, ugyanis a bifunkcionális katalázok többnyire dimer vagy tetramer formában aktívak. Ez idáig csak a halofil baktériumoknál találtak monomer formát (FUKUMORI és mtsi. 1985). A *cat2* gén nem tartalmaz intronokat, nagyfokú homológiát mutat számos gomba és baktérium katalázával. A *cat1*⁻, *cat2*⁻ deficiens törzseknek jelentősen csökkent a fertőzőképességük patkány szisztémás aspergillózis modellben (SHIBUYA és mtsi. 2006). A neutrofil sejtek által termelt hidrogén-peroxid hatására megnövekedett érzékenységet mutattak (PARIS és mtsi. 2003, SHIBUYA és mtsi. 2006).

A. nidulans-ban négy katalázt kódoló gént azonosítottak a *catA*, *catB*, *catC* és *catD* géneket. Mind a négy gén eltérő szabályozás alatt áll. A *catA* és *catB* divergens evolúció révén alakult ki, különböző exon struktúrákat tartalmaznak. A CatA és CatB a kataláz nagy

alegység családba tartoznak, valódi katalázok a hidrogén-peroxid és egyéb stressz hatások kivédésében játszanak szerepet. A *catA*-ról fokozott mRNS átíródás konídium képződéskor, valamint különböző típusú stressz hatások esetén figyelhető meg. A spórákban magas CatA szint figyelhető meg. A *catB* gén dinamikus növekedésben lévő hifákban, valamint oxidatív stressz hatására indukálódik. A *catA*, *catB*, *catC* kisalegysége peroxiszómális target szignált tartalmaz, és nagy hasonlóságot mutat a monofunkcionális katalázokkal, valamint közeli rokonságban áll archeobaktériumokban és állatokban is megtalálható katalázokkal. A CatC-re viszonylag állandó expressziós szint jellemző, nem indukálódik oxidatív, vagy egyéb stressz hatására. A CatD a fejlődés késői fázisában aktiválódik, glükóz-éhezés, hőmérsékletnövekedés, vagy növekvő hidrogén-peroxid koncentráció hatására (KAWASAKI és AGUIRRE 2001).

A. niger-ben két eltérő szabályozás alatt álló kataláz gén található: a *catA* és *catB* (KAWASAKI és mtsi. 1997, NAVARRO és mtsi. 1996). A CatA a spórában expresszálódik, míg a CatB csak a micéliumban, mindkét fehérje oxidatív stressz hatására indukálódik (LI és mtsi. 2008).

A. oryzae-ben a *catA* és *catB* gént azonosították. A CatA a spórában fejeződik ki, oxidatív stresszre nem mutat erősebb aktivitást, ezzel szemben a CatB a micéliumban expresszálódik oxidatív stressz hatására (HISADA és mtsi. 2005).

C. albicans-ban egy kataláz gén található *CAT1*. A gént izolálták és homozigóta *cat1* null-mutánsokat állítottak elő. Egér modellben végzett kísérletek azt mutatták, hogy a CAT1-nek jelentős a szerepe a disszeminált candidiázis kialakulása szempontjából. Az ilyen mutáns törzsek sokkal érzékenyebbek voltak a gazda neutrofil sejtjeinek támadásával szemben (WYSONG és mtsi. 1998).

Diabéteszes és kortizon-kezelt egér modellek fogékonyak bizonyultak a *R. oryzae* spóra infekciójára. Viszont egészséges egér tüdőszövetében nem következett be a spóra csírázása. A neutropénia, illetve a neutrofil sejtek - pl. ketoacidózis következtében föllépő - diszfunkciója megnöveli a zigomikózisok kialakulásának lehetőségét (RIBES és mtsi. 2000, NUCCI 2003, WALSH és mtsi. 2004).

3.4. Molekulamodellzés szerepe és jelentősége

Napjainkban nagyszámú bakteriális és kevés gomba kataláz fehérje röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott kristályszerkezete ismert. A háromdimenziós homológia-modellzés lehetőséget kínál számunkra, hogy összehasonlítást végezzünk egy hipotetikus fehérje és más mikroorganizmusokból származó kataláz fehérjék kísérleti úton

meghatározott háromdimenziós szerkezetével. Ezzel a módszerrel egy jó elméleti modell megalkotása válik lehetővé, amely számos információval szolgálhat a hipotetikus fehérje szerkezetére és működésére vonatkozóan.

Tudásunk foka egy problémakörön belül a megalkotott modell minőségével mérhető, ami kísérletekkel ellenőrizhető és ellenőrizendő. Modellezés tehát szükséges mind a kísérletek optimális megtervezéséhez, mind az összegyűlt adatokból levont következtetések értelmezéséhez és megértéséhez (BRUSIC és ZELEZNIKOW 1999). Az általánosító képesség (prediktivitás) a modell azon képességét jelzi, hogy mennyire pontosan tudja megjósolni az új eseteket, vagyis a modell elméleti/gyakorlati használhatóságát mutatja. A kísérlettervezésben a modellezés különösen jelentős azokon a területeken, ahol a rendszerek és folyamatok megértése kombinatorikai jellegükből adódóan nagyszámú kísérletet igényelne. A molekuláris kölcsönhatások minél pontosabb, prediktív modelljeit alkalmazó előzetes szűrés segíthet felismerni azokat a kulcsfontosságú kísérleteket, melyek szükségesek az aktuális probléma megoldásához. A releváns és pontos számítógépes modellek alkalmazhatók a laboratóriumi kísérletek kiegészítéseként (BRUSIC és ZELEZNIKOW 1999). A modell-relevancia kifejezés a feltételezések helyességére utal – melyeknek összhangban kell lenniük a tanulmányozott problémával kapcsolatos legújabb tudományos és technikai ismeretekkel.

A számítógépes modellezés eleinte a kísérleti kutatást támogató, kiegészítő technológiaként került előtérbe, de jelentősége a számítógépek kapacitásának arányában nőtt. Az olyan új megközelítési módok, mint például a genomika vagy proteomika, a gének és fehérjék kifejeződéséről hatalmas mennyiségű adatot állítanak elő (AUFFRAY és mtsi. 2003), ezek feldolgozása a lehetséges összefüggések feltárására már csak számítógéppel lehetséges, önálló számítógépes tudományterületeket keltve életre (pl. filogenetika, bioinformatika, stb.), gyökeresen új eredményekkel. Az élettudományok területén a kísérlettervezés szorosan összefonódik egy rendszerszemléletű, heurisztikus modellépítéssel, amiben az élő szervezet informatikai kódrendszere, így pl. a metabolikus vagy szabályozó folyamatok hálózata, az egyes folyamatok atomi-molekuláris szintű modellezésével integrálódik, például a transzkripció szabályozás (BEER és TAVAZOIE 2004), vagy az antigénfeldolgozás és prezentáció (FLOWER 2003), a molekula háromdimenziós szerkezetének megalkotása, aktív centrum meghatározása (ANDREOLETTI és mtsi. 2009).

A szerkezet és funkció egyértelmű meghatározottsága miatt a biológiai makromolekulák, illetve molekuláris rendszerek háromdimenziós modelljeinek

megismerése alapvető fontosságú, emiatt napjainkban erőteljes fejlődés tapasztalható a DNS, RNS, fehérje- és szénhidrátszerkezetek háromdimenziós modelljeinek meghatározása területén, mind kísérleti, mind elméleti módszerekkel. Az elméleti módszerek, így a fehérjeszerkezet homológia-modellezéssel történő kiszámítása iránti igény egyre nő, mivel a módszerek pontossága rohamosan javul és az eredmény gyorsan, a kísérleti módszerek anyag, eszköz és műszerigényéhez képest (pl. röntgendiffrakciós kristályszerkezet meghatározása esetén ciklotron) elhanyagolható költséggel megkapható. Az elméleti módszerek további előnye, hogy a molekuláris folyamatok atomi felbontással tanulmányozhatók, míg a kísérleti technikák ezt a biológiai makromolekulák esetében nem teszik lehetővé.

Mindezek alapján a fehérjék szerkezet-funkció összefüggésének vizsgálatában az első lépés lehet a megfelelő minőségű szerkezeti modell megalkotása homológia-modellezéssel, majd a modell vizsgálata a funkcióra való alkalmasság tekintetében.

3.5. Állatkísérleti modellek

Mint sok más szisztémás mikózis esetében, így a zigomikózisok kialakulásában és lefolyásában is fontos szerepet tölt be az állatkísérleti modellszervezetekben végbemenő fertőzési folyamatok tanulmányozása. Az így szerzett ismeretek, különös tekintettel a kórfejlődésre, fontos információt adnak a humán szervezetben történő fertőzések dinamikájáról, valamint támpontot adnak a diagnosztika, a kezelés és a megelőzés számára. Az esetek többségében, zigomikózisok modellszervezetben történő vizsgálatát hasonló módon lehet elvégezni, mint az aspergillózisok tanulmányozását, azonban a kísérletek során szem előtt kell tartani az *Aspergillus* spp. és a járomspórás gombák különböző voltát.

Egy jó állatmodellben lezajló fertőzési folyamatnak nagymértékben hasonlítania kell a humán szervezetben végbemenő fertőzés sok aspektusára: ilyenek például a fertőzés mértéke, a szervekben lezajló kórfolyamat mintázata, kórszövettani és fiziológiai változások hasonlósága. Kísérletek során elsőként választandó modell az egér, viszonylag olcsó, könnyű a fenntartása, nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre sok szempontból, pl. kórélettan. Patkány (VAN CUTSEM és mtsi. 1988), tengerimalac (BOELAERT és mtsi. 1993) és a nyúl (SODHI és mtsi. 1996, 1998) szintén gyakran használatos modellszervezet.

A járomspórás gombák opportunistá kórokozó szervezetek, ezért a kísérlet megkezdése előtt, gyakran szükséges a kísérleti állatok különböző szerekkel történő

előkezelése, amely által a fertőzés kialakulásához szükséges feltételeket lehet megteremteni. Ilyen szerek például az immunszuppresszió kialakításában alkalmazott citotoxikus reagensok, mint a ciklofoszfamid, vagy a kortikoszteroidok, például a kortizon-acetát és a hidrokortizon (HONDA és mtsi. 1999, MALLIS és mtsi. 2010, WALDORF és mtsi. 1982). A diabétesz kiváltására szolgáló kémiai anyag az alloxán, amelyet intraperitoneális injekció formájában adagolnak (REINHARDT és mtsi. 1981, ANAND és mtsi. 1992) vagy a streptozocin, amelyet intravénásan juttatnak be az állatokba (WALDORF és mtsi. 1984). Gyakran használják a vaskelátoló deferoramint, amely közismerten hajlamosító tényező a zigomikózisok kialakulásában (ABE és mtsi. 1990, IBRAHIMV és mtsi. 2007). Abban az esetben, ha nagy mennyiségű gombaspórát juttatunk be intravénásan, előzetes immunszuppresszió kialakítása nélkül is indukálhatunk szisztémás fertőzést, ugyanis ilyenkor a gomba közvetlenül belép a véráramba, és nem kell áttörnie magát a szervezet védekező rendszerein.

A fertőzések kialakításában fontos a megfelelő fertőzési útvonal megválasztása is. Az intravénás módszer viszonylag gyors, technikailag könnyen kivitelezhető, jól reprodukálható. A tüdőgyulladás modellezésekor a légutakon keresztül történő fertőzési útvonal a legmegfelelőbb: spóra szuszpenzió „belélegeztetése” vagy az intratracheális injekció ajánlott, viszont technikailag nehezebb, alacsonyabb reprodukálhatóságot eredményez. A rhinocerebrális mikózis modellezésekor, a célszerv az agy, ilyenkor intraszínusz injekció vagy spóra szuszpenzió „belélegeztetése” az alkalmazott módszer (REINHARDT és mtsi. 1981, ANAND és mtsi. 1992). A zigomikózisok leggyakoribb megjelenési formája a kísérleti állatokban a tüdő/szisztémás mikózis és a rhinocerebrális zigomikózis. Érdekesség hogy az utóbbi mikózisforma gyakran jelenik meg ketoacidózisban szenvedő diabéteszes betegek körében, melyet az állatkísérleti eredmények is jól tükröznek.

Számos klinikailag jelentős járomspórás gombával (*Absidia corymbifera*, *R. oryzae*, *R. microsporus* var. *rhizopodiformis*, *R. pusillus* és *Cunninghamella bertholletiae*) végeztek fertőzéses vizsgálatokat állatmodellekben. Járomspórás gombák vizsgálatára használt állatkísérleti modelleket a 1. táblázat foglalja össze.

Az állatmodell vizsgálatokkal kapcsolatos egyik probléma, hogy főként környezeti izolátumokat használnak. Klinikai és környezeti izolátumok eltérő jellemzőkkel bírhatnak, az utóbbiaknál hiányozhat néhány olyan fontos faktor, amely szerepet játszik a virulencia kialakításában.

A kísérlet során ügyelni kell a felhasznált állatok ketrecének, az alomnak, a tápnak és az itatott víznek a sterilitására. Az immunszuppresszált állatok bakteriális fertőzésének elkerülése érdekében célszerű az itatóvízbe antibiotikumot oldani, ez általában trimethoprim-sulfamethoxazole 1:5 arányú keveréke.

Zigomikózisos modellekben a kórszövettani elemzésekre nagyfokú figyelmet kell fordítani. A kísérleti állatok elhullását követően azonnal el kell végezni a boncolást. Szervek, beleértve a tüdő, agy, máj, lép, hasnyálmirigy és a vesék óvatos eltávolítását követően, makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatok elvégzése szükséges. A szervekből, fixálást követően metszeteket készítenek. Ezeket, a metszeteket különböző módszerekkel festik, ezáltal a szöveti metszetekben található gombafonalakat láthatóvá teszik. Ilyen festési módszer például a PAS-festés (*Periodicacid-Schiff*), amellyel a makromolekuláris szénhidrát komponenseket válnak láthatóvá. A PAS festés rutinszerűen használt festési eljárás a gombás fertőzések esetén, ám a járomspórás gombák általában nem festődnek túl jól ezzel a módszerrel. A legmegfelelőbb módszer GMS festés (vagy Grocott festés), de ezzel a módszerrel is változó festési eredmény érhető el, előfordulhat, hogy maradnak festetlen hifák is. A Calcofluor festés során hasonló problémával találkozhatunk szembe magunkat. Az immunhisztokémiai festések során alkalmazott monoklonális antitestek segítségével jó eredményt lehet elérni (HONDA és mtsi. 1999).

A fertőzést kialakító gomba jelenlétét és annak életképességét a szervekben tenyésztéssel is igazolni kell. A szervek eltávolításánál különös óvatossággal kell eljárni, a keresztszennyezések megakadályozása érdekében. A szervek eltávolítását, majd homogenizálását követően a szerv-szuszpenziók táptalajra történő kioltása által információt kapunk az adott szerv fertőzöttségéről. Ez a módszer kvalitatív. Kvantitatív elemzést fonalas gombák esetében nem tudunk végezni, ugyanis az esetlegesen növekedésnek indult telepek száma nem a fertőzés mértékét tükrözi, hiszen a szervek homogenizálása során, a fonalas gomba még életképes darabokra törhet, így előfordulhat, hogy egyetlen fonal törmelékéből több növekvő telepet is kapunk. A mai napig nem áll rendelkezésünkre megbízható módszer, amely szigorúan véve kvantitatív. Amennyiben a fertőzés súlyosságának szeretnénk utána járni hisztopatológiai elemzéseket célszerű végezni.

	Fertőzéshez használt gombafaj	Előkezelés/ fertőzésre fogékonnyá tevő faktor	Infekciós útvonal	Fertőzés-forma	Publikáció
Athímuszos egér	<i>Absidia corymbifera</i>	Athímuszos állapot	iv, ip, sc	szisztémás	CORBEL és EADES 1977b
Egér	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	CPA/ szteroid	it	pulmonális/ szisztémás	HONDA és mtsi. 1999
	<i>Mortierella wolfii</i>	nincs	ic	cerebrális	CORBEL és mtsi. 1977a
	<i>Rhizomucor pusillus</i>	szteroid	in	pulmonális	WALDORF és mtsi. 1982
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Diabétesz (streptozocin)	is	cerebrális	WALDORF és DIAMOND 1984
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Diabétesz (streptozocin)	in	pulmonális	WALDORF és mtsi. 1984
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Diabétesz (streptozocin)	in, ip, iv, inhalációs	pulmonális/ szisztémás	VAN CUTSEM és mtsi. 1988
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>				
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Deferoxamine	iv	cerebrális	ABE és mtsi. 1990
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Diabétesz (alloxan), desferrioxamin	is	cerebrális	ANAND és mtsi. 1992
	<i>Rhizopus oryzae</i>	szteroid	in	pulmonális/ szisztémás	SUGAR és LIU 2000
Terhes egér	<i>Absidia corymbifera</i>	Terhesség	iv	szisztémás	JENSEN és mtsi. 1995
borjú	<i>Absidia corymbifera</i>	nincs	iv	szisztémás	JENSEN és mtsi. 1993
Nyúl	<i>Absidia corymbifera</i>	Diabétesz (alloxan)	in	cerebrális	REINHARDT és mtsi. 1981
	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>				
	<i>Rhizopus oryzae</i>				
	<i>Rhizomucor pusillus</i>				
	<i>Rhizopus</i> spp.				
	<i>Mortierella wolfii</i>	nincs	iv,ic	szisztémás/ cerebrális	CORBEL és EADES 1991
	<i>Absidia corymbifera</i>	nincs	iv	szisztémás	SODHI és mtsi. 1996
	<i>Absidia corymbifera</i>	nincs	in	pulmonális/ szisztémás	SODHI és mtsi. 1998
	<i>Absidia corymbifera</i>	nincs	in	pulmonális/ szisztémás	SODHI és mtsi. 1998-99
	<i>Absidia corymbifera</i>	CPA/ szteroid	it	pulmonális/ szisztémás	SODHI és mtsi. 2000
Patkány	<i>Rhizopus oryzae</i>	Diabétesz (streptozocin)	in, ip, iv, inhaláció	pulmonális/ szisztémás	VAN CUTSEM és mtsi. 1988
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>				
Tengerimalac	<i>Rhizopus oryzae</i>	Diabétesz (streptozocin)	in, ip, iv, inhaláció	pulmonális/ szisztémás	VAN CUTSEM és mtsi. 1988
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>				
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	nincs	iv	szisztémás	VAN CUTSEM és mtsi. 1989b
	<i>Rhizopus oryzae</i>				
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	Deferoxamin	iv	szisztémás	VAN CUTSEM és mtsi. 1989a
	<i>Rhizopus oryzae</i>				
	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	Desferrioxamin	iv	szisztémás	BOELAERT és mtsi. 1993
	<i>Rhizopus microsporus</i>	Desferrioxamin	iv	szisztémás	BOELAERT és mtsi. 1994

1. táblázat: Járomspórás gombafertőzések vizsgálatára használt állatkísérleti modellek összefoglalása (KAMEI 2001).

ic: intacerebrális; in: intranazális; ip: intraperitoneális; is: intraszínusz; it: intratracheális;
iv: intravénás; sc: szubkután; CPA: cyclophosphamide

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűztük ki a járomspórás gombák közé tartozó *Rhizopus oryzae* katalázt kódoló génjeinek (*cat1*, *cat2*, *cat3*, *cat4*) azonosítását és részletes molekuláris jellemzését, valamint a kódolt fehérjék szerkezeti modelljének megalkotását. Ezért a következő konkrét célokat tűztük ki:

- 1. A *R. oryzae* oxidatív stresszel szembeni érzékenységének vizsgálata különböző tenyésztési feltételek mellett, a gomba eltérő életállapotaiban.**
- 2. A kataláz gének szekvencia és filogenetikai elemzése**
- 3. A *R. oryzae* kataláz fehérjék 3D molekulamodelljének megalkotása**
- 4. Az izolált gének kifejeződésének vizsgálata**
 - A kataláz gének transzkripciójának elemzése eltérő oxidatív viszonyok esetén és a gomba különböző fejlődési állapotokban kvantitatív PCR (qPCR) analízissel
 - A katalázok kifejeződésének vizsgálata izoenzim analízissel
- 5. *R. oryzae* és *R. microsporus* által kialakított szisztémás fertőzések vizsgálata egészséges és immunszuppresszált állati modellben**
- 6. Kataláz deléciós törzsek létrehozása**

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek

5.1.1. A kísérletek során alkalmazott gombatörzsek

Fajnév	Törzsgyűjteményi szám	Megjegyzések
<i>Rhizopus oryzae</i>	SZMC 8100	Pyr17: NRRL 395 izolátum ura- auxotróf mutáns törzse
<i>Rhizopus microsporus</i>	SZMC 13647	-

2. táblázat: A kísérletek során alkalmazott gombatörzsek

5.1.2. A baktérium-transzformáció során alkalmazott törzsek

A génklónozási munkák során az *Escherichia coli* DH5 α és TOP10F⁻ törzseket használtuk. A szubklónozási és vektorépítési munkákban a pBluescript SK⁺ (Stratagene) és a pUC18 (Fermentas) plazmidokat használtuk.

5.2. Az alkalmazott táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények

5.2.1. Az alkalmazott táptalajok és tápoldatok

A gombatörzsek fenntartásához és szaporításához alkalmazott táptalajok:

Élesztő-glükóz tápoldat/táptalaj (YEG): 1% D-glükóz

0,5% élesztőkivonat

1,5% agar táptalaj esetén

Malátás táptalaj (MEA): 1% D-glükóz

1% malátakivonat

0,5% élesztőkivonat

2% agar

Baktérium törzsek fenntartásához és szaporításához alkalmazott táptalajok:

Luria-féle tápoldat/táptalaj (LB): 1% NaCl

1% tripton

0,5% élesztőkivonat

1,5% agar táptalaj esetén (pH 7,0)

(Mindkét esetben 100 μ g/ml ampicillin antibiotikummal egészítettük ki a transzformáns törzsek szelekciójához).

PEG-mediált transzformáció során használt táptalajok:

Élesztő-pepton-glükóz tápoldat (YPG): 1% D-glükóz

1% pepton

0,5% élesztőkivonat

Minimál táptalaj (YNB): 1% D-glükóz

0,15% (NH₄)₂SO₄

0,15% Na-L-glutaminát

0,05% YNB

1,5% agar, fedőagar esetén 1% agar

(amennyiben szükséges 0,05% uracillal kiegészítve)

A táptalajokat ozmotikus stabilizátorként 0,8 M szorbitollal egészítettük ki.

5.2.2. Tenyésztési körülmények

A gomba törzsek fenntartása YNB és MEA táptalajon 4 °C-on történt, kéthavonkénti átoltással. A gomba törzsek tenyésztése MEA vagy YEG táptalajon történt 37 °C-on.

A baktérium törzsek tenyésztése a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban/táptalajon történt 37 °C-on. Felhasználásig a baktériumsejteket -70 °C -on tároltuk.

A genomi DNS kivonáshoz a tenyészeteket YEG tápoldatban 3 napon keresztül rázatva neveltük, 37 °C hőmérsékleten. Az így kapott micéliumtömeget szűrővel gyűjtöttük, steril desztillált vízzel többször átmostuk, majd -20 °C-on fagyasztva tároltuk a későbbi felhasználásig.

Az RNS kivonáshoz a tenyészeteket YEG tápoldatban 37 °C hőmérsékleten rázatva neveltük. A leoltástól számított 4 óra, 7 óra valamint 1 nap és 2 nap elteltével mintavétel történt. Az így kapott micéliumtömeget szűrővel gyűjtöttük, steril desztillált vízzel többször átmostuk. A mosást követően a micéliumot azonnal folyékony nitrogénben feltártuk és RNS kivonást végeztünk.

Összfehérje kivonáshoz és a kataláz teszthez a tenyészeteket YEG tápoldatban rázatva neveltük, 37 °C hőmérsékleten. A leoltástól számított 4 óra, 7 óra valamint 1 nap és 2 nap elteltével mintavétel történt. Az így kapott micéliumtömeget szűrővel gyűjtöttük, steril desztillált vízzel többször átmostuk.

5.3. Az alkalmazott pufferek, oldatok és reagensek

Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez és transzformációjához használt oldatok:

100 mM CaCl_2 oldat, hűtve, tárolva

70% glicerín

TCM puffer: 10 mM Tris (pH 7,5)

10 mM CaCl_2

10 mM MgCl_2

Színszelekcióhoz:

X-gal: 20 mg/ml $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$ dimetilformamidban oldva (Fermentas)

IPTG: 20 mg/ml $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrClNO}_6$ steril desztillált vízben oldva (Fermentas)

Antibiotikum törzsoldat:

Ampicillin: 50 mg/ml steril desztillált vízben oldva (Sigma)

E. coli sejtekből történő plazmid DNS tisztításához használt oldatok:

Sol I: 5mM glükóz

25 mM Tris (pH 8,0)

10 mM EDTA

RNáz 10 mg/ml

Sol II: 0,2 M NaOH

1% SDS

Sol III: 3 M Na-acetát 75% jégcetben és 25% desztillált vízben oldva (pH 4,5)

Plazmidtisztító kitek: Viogene Mini PlusTM Plasmid DNA Extraction System (Viogene),

Viogene Midi Plus V100TM Plasmid DNA Extraction System (Viogene)

Genomi DNS tisztításhoz használt anyagok:

Lízis puffer: 50 mM Tris HCl (pH 8,0)

20 mM EDTA

1% Na-lauril-szarkozin

PCI: fenol kloroform izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke

CI: kloroform izoamilalkohol 24:1 arányú keveréke

RNáz A (Sigma): 10 mg/ml törzsoldat

10 mM Tris-HCl

15 mM NaCl oldatban oldva

DNS tisztító kit: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

Gomba RNS tisztításához használt anyagok:

Lízis puffer: 30 mM Nátrium-acetát (pH 5,2)

4 M guanidin-izotiocianát

1 M β -merkaptoetanol

DEPC kezelt desztillált víz

3 M Nátrium-acetát oldat (pH 5,2)

RNS tisztító kit: E.Z.N.A. Fungal RNA Kit (Omega Bio-tek)

Gélelektroforézishez használt anyagok:

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6)

1 mM Na_2EDTA

Agaróz gél: 0,8 vagy 1% agaróz TAE pufferben oldva

Etídium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg/ml desztillált vízben oldva

Mintapuffer: 40% szacharóz

0,25 M brómfenolkék

0,2 M EDTA (pH 8,0)

6x DNS mintapuffer (Fermentas)

Molekulasúly marker: 1 kb DNS létra (Fermentas)

Protoplasztiképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok:

Protoplasztáló oldat: 100 mM Na-foszfát puffer

0,8 M szorbitol

1,5% csigaenzim

Na-foszfát-puffer (100 mM): 25 mM Na_2HPO_4

75 mM NaH_2PO_4

SMC puffer: 50 mM CaCl_2

10 mM MOPS

0,8 M szorbitol

PMC puffer: 40% PEG 4000

10 mM MOPS

0,6 M szorbitol

50 mM CaCl_2

PEG: 60% polietilén glikol $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$

MOPS: 0,5 M 3-morfolino-propánszulfonsav

Az izoenzim analízishez alkalmazott oldatok:

Fehérjekivonás:

Extrakciós puffer: 0,37 M Tris/HCl

1 mM EDTA

5 mM 2-merkaptoetanol

1% Triton X-100 (pH 7,5)

Mintapuffer: 30% glicerín

0,01% brómfenolkék

Gélkészítés:

1. **Elektród puffer törzsoldat (10x):** 2,88% glicin

0,6% Tris (pH 8,3)

2. **Szeparálógél puffer törzsoldat:** 36,6% Tris (pH 8,9)

3. **Gyűjtógél puffer törzsoldat:** 4,54% Tris (pH 6,8)

4. **Szeparálógél törzsoldat:** 39% akrilamid + 1% bisz-akrilamid

5. **Gyűjtógél törzsoldat:** 38% akrilamid + 2% bisz-akrilamid

Az izoenzim gélek összeállítása:

A/ Szeparálógél:

	7,5%
2.	18,75 ml
4.	28,84 ml
d. víz	102 ml
TEMED	0,075 ml
PER	40 mg
	150ml

B/ Gyűjtógél:

	4%
3.	10 ml
5.	5,26 ml
d. víz	34,42 ml
TEMED	0,075 ml
PER	30 mg
	50 ml

Egyéb felhasznált anyagok és reagensek:

Ciklofoszfamid monohidrát (Sigma)

Foszfát puffer sóoldat (PBS) (Sigma)

Pen-strep oldat (Sigma)

Sulfamethoxazole (Sigma)

Trimethoprim (Sigma)

H₂O₂ (Sigma): 33%-os törzsoldat

K₃(CN)₆ (Reanal): 1 M törzsoldat steril desztillált vízben oldva

FeCl₃ (Reanal)

5.4. A kísérletek során használt indító szekvenciák

Munkánk során specifikus primereket terveztünk *A. R. oryzae* kataláz gének promóter és a terminális régióinak felszaporítására. A használt primerek szekvenciáját, a felszaporított termékek méretét, és a specifikus reakciót biztosító primerek bekötési hőmérsékleteit a 3. táblázat foglalja össze.

A. R. oryzae kataláz gének transzkripciójának valós idejű (Real-Time) kvantitatív PCR (qPCR) módszerrel végzett elemzéséhez használt specifikus primereket a 4. táblázat tartalmazza.

PCR primer párok	(5'-3')	Felszaporított kataláz génszakasz	PCR termék mérete (bp)	Bekötési hőm. (°C)
9804 cat1 9804 cat2r	tttcgagctcactgctggtgcctg* ttccgcgccgctggtgaccaacttgag*	cat1 5' (cat1 gén eleje)	805	62,75 68,37
RhOcat1 dw1 RhOcat1 dw2r	ttcctcgagcgcaagcagcaatat* ttcggtagccgtactgctattcgat*	cat1 3' (cat1 dw)	803	65,27 59,27
RhOcat2 up1 RhOcat2 up2r	ttcgagctcgattagatcatagtgcatt* ttcgcgccgctgtacataatgatt*	cat2 5' (cat2 up)	726	60,12 63,27
RhOcat2 dw1 RhOcat2 up2r	ttcctcgagccgctgtaataatta* ttcggtagccgctgtcaggtattcta*	cat2 3' (cat2 dw)	846	59,31 61,11
RhOcat3 up1 RhOcat3 up2r	ttcgagctcgtgtagacttcgt* ttcgcgccgctgatgtctattctt*	cat3 5' (cat3 up)	867	61,35 62,30
RhOcat3 dw1 RhOcat3 dw2r	ttcctcgaggtacacctatggtttccat* ttcggtagccgctcgatgtgaacat*	cat3 3' (cat3 dw)	934	60,59 61,82
Rcat 1E Rcat 6C	atgagtttagacgattgata attatgagcagtcgcagctt	cat5'cat' (cat4 up+gén eleje)	1201	44,4 54,4
Rcat l 3 Rcat l4	ggatcgatgtcaatcaagctagcga tcaattgtgtgtaaacctgtaggt	cat"cat3' (cat4 gén vége+dw)	1495	59,2 55,9

3. táblázat: A PCR alapú technika során a *R. oryzae* kataláz gének promóter és a terminális régióinak felszaporításához használt specifikus primerek, felszaporított termékek neve és mérete, primer bekötési hőmérsékletek.

*az aláhúzott szakasz a restrikciós enzimek hasító helyét jelöli.

PCR primer párok	(5'-3')	Felszaporított kataláz génszakasz	PCR termék mérete (bp)	Bekötési hőm. (°C)
reti04f 7 reti04r 8	acc ctg ata ctc acc gtc atc gtc cgc tga tga tta gag aca cgg cac	cat1	87	67,81 67,73
reti26f 3 reti26r 4	cct gat gga acc tca tcc cgc t gca acg gcc tta cca gag aca g	cat2	105	68,53 67,69
reti27f 9 reti27r 10	ctt ttg ttc gct tct cta ccg tcc ggc atc cag atc cca gtt tcc	cat3	115	65,52 65,27
reti95f 1 reti95r 2	aca agc ctg aac ctg ttt ctc cca agc ttc ttg cca tgt ttg cct ctc	cat4	97	68,45 67,96
reti-aktin f1 reti-aktin r2	gcc att caa gct gtc ctt tcc cca tca cca gag tca aga acg a	aktin	72	64,23 64,32

4. táblázat: A *R. oryzae* kataláz gén transzkripciójának valós idejű (Real-Time) kvantitatív PCR (qPCR) módszerrel végzett elemzéséhez használt specifikus primerek.

5.5. A kísérleti munka során összeállított transzformáló vektorok

A négy kataláz gént PCR technika segítségével felszaporítottuk és szabályozó régióival együtt pBluescript SK+ plazmidba (Stratagene) klónoztuk. A kódoló részt határoló szakaszokat használtuk a későbbiekben a transzformáló vektorok létrehozására.

A transzformánsoknak hordozniuk kell egy szelekciót biztosító gént. Rendelkezésünkre állt egy uracil auxotrófiával markerezett *R. oryzae* mutáns törzs (RA-99-880), illetve az ezen auxotrófiát komplementáló gén az orotidin-5"-monofoszfát dekarboxilázt kódoló *pyrG* gén (BENITO és mtsi. 1992) pBluescript SK+ vektorba építve (pEPM901, BENITO és mtsi. 1992).

A plazmidok ampicillin rezisztencia gént tartalmaztak a vektort hordozó *E. coli* törzsek szelekciós markereként.

A kataláz deléció törzsek létrehozásához épített vektorok:

- A pLBcat1 plazmid esetén a *M. circinelloides pyrG* gént a *R. oryzae cat1* (RO3G_09804.3) kataláz gént határoló régiók közé építettünk pBluescript SK vektorban.
- A pLBcat2 plazmid esetén a *M. circinelloides pyrG* gént a *R. oryzae cat2* (RO3G_09026.3) kataláz gént határoló régiók közé építettünk pBluescript SK vektorban.

- A pLBcat3 plazmid esetén a *M. circinelloides pyrG* gént a *R. oryzae cat3* (RO3G_09027.3) kataláz gént határoló régiók közé építettünk pBluescript SK vektorban.
- A pLBcat4 plazmid esetén a *M. circinelloides pyrG* gént a *R. oryzae cat4* (RO3G_16995.3) kataláz gént határoló régiók közé építettünk pUC18 vektorba.

5.6. Vizsgálati módszerek

5.6.1. Genomi DNS tisztítása

A járomspórás gombák genomi DNS-ének kivonásához a micéliumot folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban elporítottuk. A feltárt micéliumhoz grammonként 2,5 ml lízis puffert adtunk és a homogén állapot eléréséig üvegbottal kevergettük. RNáz-t adtunk a homogenizátumhoz (20 µg/ml koncentrációban), majd a lízis elősegítéséhez 15-20 percig 65 °C-on inkubáltuk, majd szobahőmérsékletre történő hűtés után centrifugáltuk (8000 g, 10 perc, 4 °C). A felülúszóhoz azonos térfogatú PCI-t adtunk, ezután 4 °C-on 2-3 órán át enyhén ráztuk (45 rpm). Centrifugálás (8000 g, 15 perc, 4 °C) után a vizes fázishoz kétszeres térfogatú 96%-os etanolt adva a DNS-t 30 percig -70 °C-on kicsaptuk, majd centrifugálással (13000 g, 20 perc, 4 °C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, majd 200 µl desztillált vízbe visszaoldottuk. (ITURRIAGA és mtsi. 1992).

5.6.2. RNS tisztítás *R. oryzae*-ből

Az össz-RNS kivonáshoz a spórákat és a micéliumot folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban elporítottuk. Az RNS tisztítást az E.Z.N.A. Fungal RNA Kit (Omega Bio-tek) segítségével, a gyártó utasításai szerint végeztük. A minták RNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel és ND-1000 V program (3.3.0. verzió) segítségével 260 nm-en mértük. A mintákat további felhasználásig -70 °C -on tároltuk.

5.6.3. DNS gélelektroforézis

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk. A mintákat 1/5 mennyiségű mintapuffer hozzáadása után 0,8 illetve 1%-os agaróz/TAE gélen elválasztottuk (80 V, 1-1,5 óra). A nukleinsavak detektálása etídium-bromidos festést követően (0,5 µg/ml) UV fényben történt. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os illetve pUC mix molekulasúly markereket (Fermentas) használtunk.

5.6.4. DNS izolálása agaróz gélből

A PCR és a restrikciós emésztések során kapott DNS fragmentumokat tartalmazó gél részletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0,8% agarózt tartalmazó gélből. A kivágott géldarabból a DNS-t a DNA Extraction Kit (Fermentas) vagy a Gel-M™ Gel Extraction System (Viogene) kit segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

5.6.5. PCR technikák

A kísérleti munka során többféle PCR módszert használtunk. Az amlifikáláshoz T3 Thermocycler (Biometra), valamint MJ Mini (Bio-Rad) készülékek alkalmaztunk. A Real-time PCR esetében C1000 Thermal Cycler-t CFX96 Real-Time System detektáló rendszereket alkalmaztunk.

Génklónozáshoz, vektorépítéshez alkalmazott reakciókörülmények

A reakciókat Long PCR enzim mix (Fermentas), vagy Dupla-Taq DNS polimeráz (ZenonBio) kitek segítségével mértük össze 25 µl végtérfogatban. A PCR reakciók során a kötődési és a lánchoszabbítási időket az adott primerekhez, illetve a várt fragmentum hosszhoz igazítottuk.

A *cat1*, *cat2*, *cat3* kataláz gének határoló régióinak klónozásakor a PCR reakcióelegyek összetétele:

20-50 ng genomi DNS
0,4 µM specifikus primer I
0,4 µM specifikus primer II
0,4 mM dNTP mix (Fermentas)
1x Long PCR puffer MgCl₂-al (Fermentas)
1,25 U Long PCR enzim mix (Fermentas)

A PCR reakció körülményei:

1.	94 °C, 3 perc	1 ciklus	denaturálás
2.	94 °C, 20 mp	5 ciklus	denaturálás
3.	38 °C, 1 perc		primer kötődés
4.	72 °C, 5 perc		láncszintézis
5.	94 °C, 20 mp	5 ciklus	denaturálás

6.	43 °C, 1 perc		primer kötődés
7.	72 °C, 5 perc		láncszintézis
8.	94 °C, 20 mp	25 ciklus	denaturálás
9.	50 °C, 1 perc		primer kötődés
10.	72 °C, 5 perc		láncszintézis
11.	72 °C, 10 perc		végso láncszintézis

A *cat4* kataláz gén klónozásakor a PCR reakcióelegy összetétele:

20-50 ng genomi DNS
 0,4 µM specifikus primer I
 0,4 µM specifikus primer II
 0,4 mM dNTP mix (Fermentas)
 1x *Dupla-Taq* puffer (ZenonBio)
 2,5 mM MgCl₂ (ZenonBio)
 2 U *Dupla-Taq* DNS polimeráz (ZenonBio)

A PCR reakció körülményei:

1.	94 °C, 2 perc	1 ciklus	denaturálás
2.	94 °C, 30 mp	10 ciklus	denaturálás
3.	56 °C, 1 perc		primer kötődés
4.	72 °C, 3 perc		láncszintézis
5.	94 °C, 30 mp	20 ciklus 5 sec	denaturálás
6.	56 °C, 1 perc		primer kötődés
7.	72 °C, 3 perc		láncszintézis
8.	72 °C, 10 perc	1 ciklus	végso láncszintézis

cDNS szintézis (reverz transzkripció)

Az RNS mintákat DNáz kezeltük a gyártó utasítása szerint:

1 µg RNS
 1x-DNáz puffer (2,5 mM MgCl₂-dal)
 1 U RNáz inhibitor
 1 U DNáz (Fermentas)

Az elegyet 30 percig inkubáltuk 37 °C-on, ezt követően 5 mM EDTA-t adtunk hozzá a reakció leállítására, majd 10 percig 65 °C-on tovább inkubáltuk. A DNáz kezelést követően ellenőrző PCR reakciót mértünk össze a kezelés hatékonyságát vizsgálva ezzel.

A DNáz kezelést követően az RNS mintákból a reverz transzkripciót RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit-el (Fermentas) végeztük a gyártó utasításai szerint.

0,1-100 µg RNS

5 µM oligo (dT)₁₈ vagy random hexamer primer

1 mM dNTP mix

A mintákat 5 percig 65 °C-on kezeltük, majd 4 °C-ra hűtöttük. A további reakciókomponenseket adtunk hozzá:

1x RT Buffer

20 U RNáz inhibitor

200 U RevertAid Premium Enzyme Mix Reverse Transcriptase enzim

A reakcióelegyet 10 percig 25 °C-on kezeltük, majd 60 perc 42 °C-on inkubációt követően 5 percig tartó 85 °C-os kezeléssel állítottuk le a reakciót.

Valós idejű PCR reakciók transzkripció szintek meghatározásához

A reakciókat Maxima™ SYBR Green Master Mix segítségével (Fermentas) mértük össze. A relatív transzkripció szintek számítása a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel történt (LIVAK és SCHMITTGEN 2001).

A reakciók összemérése 20 µl végtérfogatban történt 96 lyukú lemezekben

20-50 ng cDNS

0,4 µM specifikus primer I

0,4 µM specifikus primerII

1x SYBR Green Master Mix

A valós idejű PCR során alkalmazott reakciókörülmények:

1.	95 °C, 3 perc		denaturálás
2.	95 °C, 15 mp	40 ciklus	denaturálás
3.	60 °C, 30 mp		primer kötődés
4.	72 °C, 30 mp		láncszintézis

Melting curve analízis:

1.	95 °C, 3 perc	1 ciklus
2.	65 °C, 2 perc	1 ciklus
3.	55 °C -95 °C 10 másodperc 0,5 °C -onként emelkedő hőmérséklet	

5.6.6. Génklónozás során alkalmazott módszerek

Restrikciós emésztések, ligálás

A restrikciós emésztéseket, ligálásokat a standard módszerek szerint végeztük (SAMBROOK és mtsi. 1989) mindig az adott körülményekhez optimalizálva. A DNS fragmentumokat pBluescript SK+ (Stratagene) vagy pUC18 (Fermentas) klónozó vektorokba ligáltuk. A PCR reakcióból származó fragmentumok tisztítását PCR-M Clean Up System (Viogene) kittel végeztük. A ligálást T4 DNS ligázzal (Fermentas) 16 órán keresztül 16 °C-on végeztük, majd 10 perces, 65 °C-os hőkezeléssel állítottuk le a reakciót.

7 µl DNS fragmentum

1 µl pBluescript SK+ plazmid

1 µl T4 DNS ligáz puffer (Fermentas)

5 U T4 DNS ligáz enzim (Fermentas)

Plazmid DNS tisztítása

Az ampicillin tartalmú (7 µg/ml) LB tápoldatban nevelt transzformáns sejteket centrifugálással (8000g, 2 perc) kiülepítettük, majd a tápoldat eltávolítása után a sejteket 150 µl Sol I oldatban felvettük, felszuszpendáltuk és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákhoz 200 µl Sol II oldatot adtunk, majd 10 percig jégen állni hagytuk. A sejtek szétesését követően a fehérjéket 150 µl Sol III oldat hozzáadásával kicsaptuk ki, ezt követően 15 perc, 4 °C-on inkubáltuk. Majd centrifugálással kiülepítettük a fehérjéket (8000 g, 10 perc). A minták felülúszójából a plazmid DNS alkoholos tisztítást és szárítást követően vízben oldottuk. Az így kitisztított plazmid DNS-t további plazmid konstrukciók létrehozásánál használtuk fel. Esetenként a Viogene Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System (Viogene) kit-et is használtuk, a gyártó utasításai szerint. Nagyobb mennyiségű plazmid DNS kinyerését transzformálási kísérletekhez a Viogene Midi-V100TM Plasmid DNA Extraction System (Viogene) gyári kit-tel végeztük.

5.6.7. DNS szekvenciák meghatározása és elemzése

A klónozott DNS fragmentumok szekvenálása az MTA Szegedi Biológiai Központjában történt. A DNS szekvenciák ellenőrzését a Chromas program (1.5 verzió, Technelysium) segítségével végeztük. A DNS szekvenciák ellenőrzése a Chromas program

segítségével történt, míg a nukleotid szekvenciák analízisét az NCBI BLAST 2 programjának segítségével végeztük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A gének nukleotid és a kódolt fehérjék aminosav sorrendjének elemzésére az „Expasy” proteomikai szerveren (<http://www.expasy.ch>) hozzáférhető programokat használtuk. A fehérjék alapvető paramétereinek számítására a ProtParam (GASTEIGER és mtsi. 2005), a szignálpeptidek megállapítására a SignalP (BENDTSEN és mtsi. 2004) programokat használtuk. A fehérjék doménjeinek és motívumainak hasonlóság alapján történő predikciója a Motif Scan (MyHits) program segítségével történt (PAGNI és mtsi. 2007).

5.6.8. Kompetens *E. coli* sejtek készítése

E. coli TOP10F törzsének 14 órás LB tápoldatban nevelt tenyészetéből 3 ml-t 30 ml LB tápoldatba átolva a baktériumokat $OD_{600} = 0,6$ érték eléréséig növesztettük (200 rpm, 37 °C). A tenyészet 15-15 ml-ét centrifugáltuk (2160 g, 10 perc, 4 °C), majd a sejteket azonos mennyiségű 4 °C-os, 100 mM-os $CaCl_2$ oldatban felfuszpendáltuk. Az előbbi műveletet megismételtük, majd a 100 mM-os, 4 °C-os $CaCl_2$ oldatban felvett sejteket 1 órán át jégfürdőben inkubáltuk, ezt követően újra centrifugáltuk (2160 g, 10 perc, 4 °C). A kiülepedett sejteket 1/20 térfogatú, 100 mM-os 20% glicerol tartalmú hideg $CaCl_2$ oldatban szuszpendáltuk fel és 200 µl mennyiségenként Eppendorf csövekbe osztottuk szét, ezeket -70 °C-on fagyasztva tároltuk.

5.6.9. *E. coli* sejtek transzformációja

A baktériumok transzformációját a SAMBROOK és mtsi. (1989) által ismertetett módon hajtottuk végre. 200 µl fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 5-10 µl ligátumot (plazmidot) és 100 µl TCM puffert adtunk hozzá. Összekeverés után 25 percig jégen inkubáltuk, ezt követően 3,5 perces 37 °C-os hő sokkot alkalmaztunk, majd a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A mintákból különböző mennyiségeket szélesztettünk 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajra 40 µl IPTG (20 mg/ml, Fermentas) és 40 µl X-gal (20 mg/ml, Fermentas) jelenlétében.

5.6.10. Protoplasztképzés *R. oryzae*-ből

A protoplasztáláshoz *R. oryzae* uracil auxotróf törzs MEA táptalajon nevelt 4 napos tenyészetéről steril desztillált vízzel mostuk le a sporangiospórákat. Majd a tömény

spóraszuszpenzióból YEG táptalaj felszínére helyezett celofánkorongokra oltottunk oltókorong segítségével. A tenyészeteket 14-16 órán keresztül inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten. A celofánon nevelt fiatal telepeket protoplasztáló oldatba helyeztük, majd 3 órán át 28 °C-on protoplasztáltuk. A sejtfal oldására a protoplasztáló oldathoz 1,5% saját készítésű, csigaenzimet adtunk. Majd a keletkezett protoplasztokat elválasztottuk a micélium törmeléktől, steril gézen való átszűréssel. Az átszűrt protoplasztokat mostuk SMC pufferrel, majd centrifugáltuk (2160 g, 15 perc, 4 °C). Ismételt SMC pufferrel történő mosás után a protoplasztokat újra centrifugáltuk. A kiülepített protoplasztokat 200 µl SMC pufferben vettük fel, majd Bürker kamrában meghatároztuk a protoplasztok számát.

5.6.11. Gomba protoplasztok PEG-mediált integratív transzformációja

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijck és Roncero (1984) által leírt PEG-mediált transzformáció módosítása. A micéliumtól megtisztított, SMC pufferrel átmosott protoplasztokat 200 µl SMC pufferbe vettük fel. Ehhez hozzáadtuk a restrikciós emésztéssel linearizált transzformáló DNS-t (kb. 5 µg). A transzformáció elősegítése érdekében 20 µl PMC-t adtunk a protoplaszt-DNS keverékhez. Ezt követően a mintákat 30 percig jégen inkubáltunk. Ezután további 2,5 ml PMC puffert adtunk a protoplasztokhoz, majd azt szobahőmérsékleten 25 percig inkubáltuk. A protoplasztokat 20 ml SMC pufferrel hígítottuk, majd centrifugáltuk. A kiüledett sejteket 0,8 M szorbitot tartalmazó YPG tápoldatban regeneráltattuk 25 °C-on 30 percig, majd mostuk SMC pufferrel. A kiülepített sejteket 1 ml SMC pufferbe vettük fel és 0,8 M szorbittal kiegészített YNB fedő agarral összekeverve 0,8 M szorbitot tartalmazó YNB táptalajokra öntöttük. A csészéket 37 °C-on inkubáltuk.

5.6.12. In vitro oxidatív stressz kísérletek

Hidrogén-peroxid által kiváltott stressz hatásának vizsgálata mikrotiter lemezen:

A leoltást 96 mintahelyet tartalmazó mikrotiter lemezen végeztük el. Az egyes mintahelyekre 100-100 µl hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatot (YEG és YNB) vittünk fel, majd ehhez 100-100 µl tápoldatban elkészített spóraszuszpenziót oltottunk. Az alkalmazott inokulum töménysége 10^5 spóra/ml volt *R. microsporus* és *R. oryzae* esetén is. Az alkalmazott hidrogén-peroxid koncentrációk a 200 µl térfogatban a következők voltak: 0,078 mM, 0,152 mM, 0,312 mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 1,5 mM, 1,75 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM és 5 mM. A leoltott lemezeket 37 °C-on inkubáltuk, majd 24, 48 és 72 óra

elteltével, Jupiter HD fotométer (ASYS Hitech GmbH) és DigiRead program (1.2.0.2. verzió) segítségével 620 nm-en mértük a minták optikai denzitását. A kapott értékekből kivontuk a tápoldat színe által mérhető háttérrel. A növekedés gátlás mértékének meghatározásához használt kontrollok esetében a tápoldatok nem tartalmaztak hidrogén-peroxidot. Az így mért növekedést vettük 100%-nak.

Hidrogén-peroxid által kiváltott stressz hatásának vizsgálata táptalajon:

A vizsgálatokat YNB táptalajon 90 mm átmérőjű Petri csészén végeztük Robbertse és mtsi. (2003) szerint. A táptalajhoz a sterilizést követően adtuk a hidrogén-peroxidot a kívánt koncentrációkban, melyek a következők voltak: 0,0625 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM. A megszilárdult táplemez felületének középpontjába 3 mm átmérőjű micélium korongot helyeztünk. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, majd 24 és 48 óra elteltével meghatároztuk a telep átmérőt.

5.6.13. A spóra csírázás vizsgálata

R. oryzae uracil auxotróf törzs csírázási dinamikáját YEG tápoldatban történő leoltást követően, 37 °C-on 200 rpm-en rázatott tenyésztése mellett, határoztuk meg. 10^5 db spórát oltottunk 100 ml YEG tápoldatba, valamint 100 ml 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített YEG tápoldatba. A tenyészetből óránként mintát gyűjtöttünk és mikroszkópos vizsgálat alá vetettük. A spórák csírázásának dinamikáját fotókkal dokumentáltuk.

5.6.14. Katalázok aktivitásának meghatározása

Fehérje kivonás:

A *R. microsporus* és *R. oryzae* uracil auxotróf törzs MEA táptalajon 3 napon keresztül nevelt tenyészetéről steril desztillált vízzel mostuk le a sporangiospórákat, majd 10^8 db spórát oltottunk 200 ml YEG tápoldatot tartalmazó lombikba. A stresszhatás vizsgálata 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített YEG tápoldatban zajlott. Tenyésztési körülmények: 200 rpm, 37 °C minden minta esetében. A frissen szüretelt micéliumot folyékony nitrogénben, kvarchomok jelenlétében szétdörzsöltük, majd 2,5 ml jéghideg PBS puffert adtunk hozzá. Kémcsőkeverővel megkevertük, ezután néhány percig jeges vízfürdőben inkubáltuk. Az extrahálást követően a mintát 4 °C-on 30 percig centrifugáltuk (10000 g). A centrifugálást után a felülúszót óvatosan lepipettáztuk, úgy hogy micélium törmelék ne kerüljön bele. Az így kapott mintát a felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A

minták összfehérje koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel és ND-1000 V program (3.3.0. verzió) segítségével 280 nm-en mértük.

Kataláz teszt

A kataláz teszthez Catalase Assay Kit-et (Calbiochem) használtunk. A kit a kataláz aktivitást a metanolból a kataláz segítségével hidrogén-peroxiddal képződő formaldehid mennyiségének meghatározásával méri. A protokoll alapján számolt enzim aktivitásokat a mintaelőkészítésből adódó hígítással szoroztuk (2,5 ml/20 µl) és 1 g nedves micélium tömegre vonatkoztatva specifikus aktivitást határoztunk meg.

5.6.15. Izoenzim analízis

Fehérje kivonás:

Az alkalmazott törzsek és a tenyésztési körülmények megegyeznek a 5.6.14. pontban leírtakkal. A mintagyűjtést követően 1,5 gramm micéliumot folyékony nitrogénbe azonnal lefagyasztottunk és kvarchomok jelenlétében szétdőrszöltük, majd 2.5 ml jéghideg extrakciós puffert adtunk hozzá. Kémcsőkeverővel megkevertük, ezután néhány percig jeges vízfürdőben inkubáltuk. Az extrahálást követően a mintát 4 °C-on 30 percig centrifugáltuk (10000 g). A centrifugálás után a felülúszót (fehérjekivonatot) óvatosan lepipettáztuk, úgy hogy a micélium törmelék ne kerüljön a felső fázisba. A minták összfehérje koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel és ND-1000 V program (3.3.0. verzió) segítségével 280 nm-en mértük. Mérést követően a fehérjemintákat extrakciós puffer hozzáadásával azonos töménységre állítottuk be. Ezt követően 1:3 arányban mintapuffert adtunk a fehérje kivonatokhoz, alaposan elkevertük. Az így kapott mintát a felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

Fehérje gélelektroforézis:

A fehérje minták izoenzim analízisét poliakrilamid gélen történő elválasztással végeztük. 100-100 µl mintát vittünk fel a gélre. Az elválasztás, rövid előfuttatás után (15 perc, 240 V), állandó feszültség mellett (220 V) 14 órán át történt. Minden kísérletet a Protean II vertikális elektroforézis rendszerben (Bio-Rad) végeztünk 1.5×100×160 mm-es géllapok alkalmazásával.

Enzimaktivitás detektálás:

Az üveglapok közül eltávolított gélből a gyűjtőgél levágtuk és a szeparáló gél, a WOODBURY és mtsi. (1971) által kidolgozott ferricianidos kataláz előhívási módszerrel festettük meg. A gél desztillált vízben mostuk (3 x 15 perc), majd szobahőmérsékleten 0,003% H₂O₂-ot tartalmazó desztillált vizes oldatban inkubáltuk 10 percig. Gyors desztillált vizes öblítést követően, a gél 2% FeCl₃ - 2% K₃(CN)₆ oldatba helyeztük, majd sötétben 10 percig állandó rázatás mellett inkubáltuk. Ezt követően a gél desztillált vízben háromszor mostuk. A kataláz aktivitást sötétzöld háttéren megjelenő sárga sávok jelezték.

5.6.16. Állatkísérlet

Immunszuppresszió

A kísérlethez 6-8 hetes CFLP nőstény egereket használtunk, átlagsúlyuk 25-28 g között volt. Gombatörzsenként 10-10 db egérrel dolgoztunk. A vizsgálat 12 óra sötét és 12 óra megvilágított napi periódus mellett zajlott, 25 °C-os teremben, a beáramló levegő és a terem levegőjének állandó sterilizálása mellett. A ketrecek és az alom patogénmentesítés után kerültek felhasználásra. (Ketrecek felületi fertőtlenítővel lettek patogénmentesítve, az alom 12 órán át UV lámpával volt kezelve). Drog indukálta immunszuppressziót váltottunk ki a CFLP egerekben. A fertőzést megelőzően, a -3., -2. és -1. napon, valamint a fertőzést követő +1. napon 200 mg/kg ciklofoszfamiddal oltottuk az állatokat intraperitoneálisan. A kontroll csoport és az abszolút kontroll csoport PBS pufferrel (foszfát-puffer) lett oltva. Az oltásokat megelőzően, minden egyed súlyát lemértük, ennek megfelelően lett az immunszuppresszív anyag dózisa meghatározva és adagolva/egér. Bakteriális fertőzések elkerülése érdekében trimetoprim-szulfametoxazol (Bactrim; 600 mg/l víz) 1:5 arányú keverékét adagoltuk az immunszuppresszált állatok előzőleg sterilizett itató vizébe, (a kontroll egér csoportok steril csapvizet kaptak, bactrim hozzáadása nélkül).

Infekció

A 0. napon inhalációs módszerrel fertőztük az állatokat 10⁵ spóra/25 µl/egér (CHANG és mtsi. 1998). A fertőzést *R. oryzae* uracil auxotróf törzs, valamint *R. microsporus* törzs sporangiospórával hajtottuk végre. A kontroll egér csoport *R. oryzae* uracil auxotróf törzsével lett fertőzve. Ezen felül egy abszolút kontroll csoportot is alkalmaztunk, amely PBS puffert kapott intraperitoneális infekció során 20 µl PBS puffert inhaláltattunk (spórával nem lett fertőzve).

Infekció vizsgálata

Az infekciót követően az egyedeket az előkísérletek alapján meghatározott napokon boncoltuk fel. A szerveket lemértük és PBS pufferben tároltuk 4°C-on a boncolás végeztéig. Majd a szervekből, szervszuszpenziót készítettünk üveg homogenizátorral. Tömény mintákból és azok 10x-es hígításából penicillin-streptomocinnal kiegészített YEG táptalajra 100 µl-t szélesztettünk. 12 órán át 37°C-on inkubáltuk a csészéket.

5.6.17. A kataláz gének filogenetikai elemzése

A filogenetikai elemzést egyrészt az NCBI GenBank-ból letöltött monofunkcionális katalázok aminosav sorrendjével végeztük, másrészt a *R. oryzae*, a *M. circinelloides* és a *Phycomyces blakesleeanus* (DoE Joint Genome Institute; *M. circinelloides* CBS277.49 v1.0; <http://genome.jgi-psf.org/Mucci1/Mucci1.home.html>; DoE Joint Genome Institute *P. blakesleeanus* v1.1; <http://genome.jgi-psf.org/Phybl1/Phybl1.home.html>) genom adatbázisából letöltöttük a monofunkciós katalázokkal homológiát mutató hipotetikus fehérjék szekvenciáit. A szekvenciák elemzését a következő megközelítéssel végeztük: a nagyobb csoportok azonosítását egy elsődleges, ClustalW segítségével történt szekvenciaillesztés felhasználásával készítettük (THOMPSON és mtsi. 1994), az ebből számolt Neighbour Joining fa alapján. Az így kapott csoportok szekvenciáit külön is illesztettük a ProbCons (DO és mtsi. 2005) szoftver alkalmazásával. Az adatokból aminosav helyettesítési mátrixot számoltattunk, 10 kezdő-ismétlésben. A minél jobb illesztés érdekében elvégeztettük a műveletet 25 ismétlésben. Az így nyert illesztések alapján törzsfákat számoltattunk a Bayes analízis alkalmazásával, a MrBayes szoftver 3.2.1. verziójának felhasználásával (RONQUIST és HUELSENBECK 2003). Az adatokhoz legjobban illeszkedő szubsztitúciós modell becslését a Reversible Jump MCMC megközelítés szavatoalta. A Markov láncokat hárommillió generáción keresztül futtattuk, minden századik generációból történő mintavétel-beállítással. A *burn-in* értékét 1 000 000-ban határoztuk meg, az első 10 000 fát kizártuk az elemzésből. A fennmaradó fákban 50% többségi konszenzus fát számoltattunk, melyen a 0,95-nél magasabb poszterior valószínűségi értékekkel bíró elágazási pontokat tekintettük szignifikáns támogatottságúnak.

5.6.18. A háromdimenziós szerkezet homológia-modellezése

A homológia-modellezéshez a MODELLER (9.9) programot használtuk (ŠALI és mtsi. 1993), mivel ez a program jól konfigurálható Linux környezetben (Kubuntu 11.4,

Mandriva 2011) és számos beépített eszközzel segíti a homológia-modellezést. Ezek közül a következőket használtuk ki: több láncból álló fehérjekomplex modellezése a láncok egymáshoz illesztésével lehetséges; tetszőleges számú (több láncból álló) templáthoz illesztés megengedett. Továbbá, nem fehérje egyéb szerves, vagy szervetlen komponensek figyelembe vétele lehetséges; a konkrét másodlagos szerkezettel nem jellemezhető részek az erre a célra kifejlesztett „dopehr_loopmodel” modullal pontosabban közelíthetők, mint az „allhmodel” modullal; szimmetrikus komplexek esetében a szimmetria a modellezésbe bevonható. A négy láncból álló homotetramer esetében ezek együttes alkalmazása szükséges volt. További előnye a MODELLER programnak, hogy algoritmusának végén egy molekuladinamikai, szimulált anellációs szerkezetfinomítási lépést alkalmaz Charmm22 molekuláris erőteret alkalmazva. A kapott szerkezetek közül a MODELLER „iterative_structural_align” moduljával kapott, az összeillesztett háromdimenziós szerkezetek százalékos átfedését kifejező értékkel (SO) rangsorolva kerültek kiválasztásra a több templátos illesztéshez legalkalmasabb templátok. A több (4) lánchoz történő illesztéseknél azon pdb fájlok esetében, amelyeknél a tetramerből csak az aszimmetrikus egység volt megadva, a MakeMultimer.py python programot (<http://watcut.uwaterloo.ca/cgi-bin/makemultimer>) alkalmaztuk a teljes szerkezet helyreállítására. A szerkezetek megjelenítése a VMD programcsomaggal történt (HUMPHREY és mtsi. 1996). A homológia-modellezéssel nyert szerkezet ellenőrzését a PROCHECK programmal (LASKOWSKI és mtsi. 1993), a homológia-modellezéssel kapott szerkezet további molekuladinamikai finomítását az NAMD programmal végeztük (PHILLIPS és mtsi. 2005). A dinamikai számítások a Charmm27 erőterrel történtek, a kiindulási, az összes hidrogén atomot tartalmazó koordináta fájlok (pdb formátum) és a Charmm topológia fájlok (psf formátum) előállítását a VMD programcsomag psfgen moduljával hajtottuk végre. A számítások az SzBK Biokémiai Intézetben működő Linux számítógép klaszteren történtek.

Linux klaszter:

A Linux HPC klaszter működtetése a „Rocks Cluster Distribution” (<http://www.rocksclusters.org/>) 5.4.2 verziójával történt, a számítások végrehajtását az SGE roll („Sun Grid Engine” feladat ütemező, <http://gridengine.sunsource.net/>) vezérelte. A klaszter vezérgépe a Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetének a tulajdona.

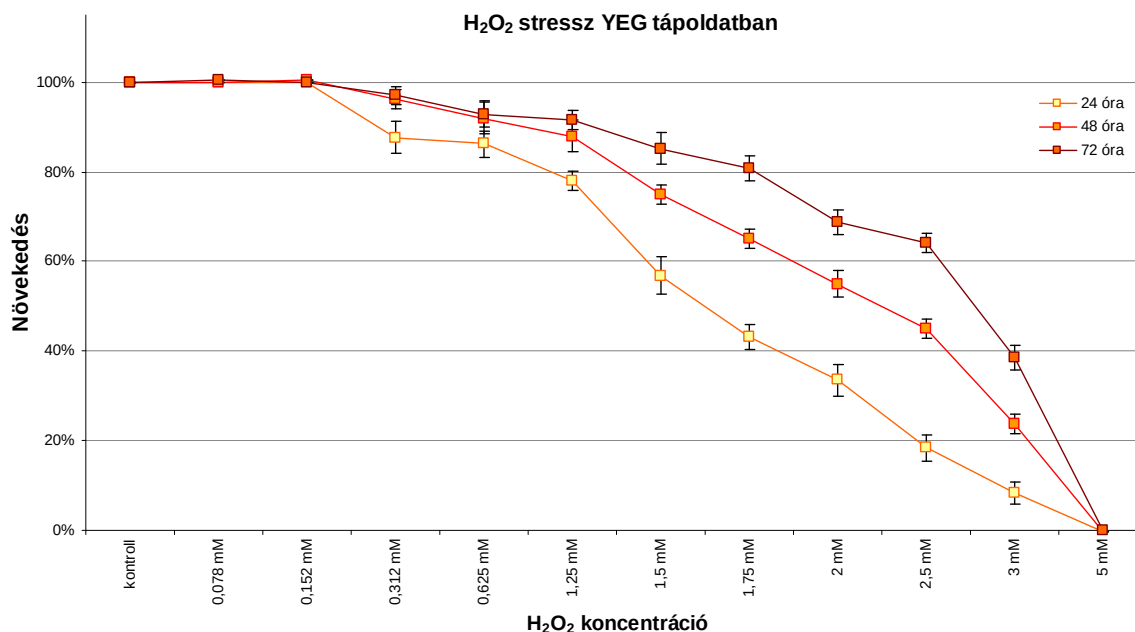
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK

6.1. A *R. oryzae* oxidatív stresszel szembeni érzékenységének vizsgálata különböző tenyésztési feltételek mellett, a gomba eltérő életállapotaiban

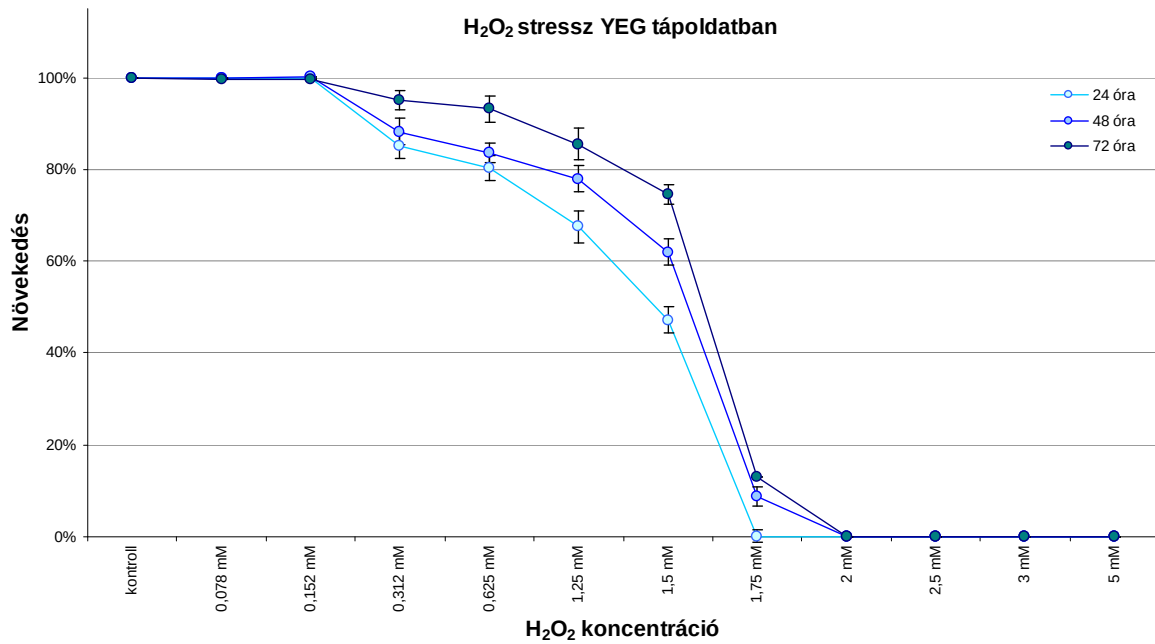
6.1.1. Hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz hatásának vizsgálata mikrotiter lemezen

A neutrofil granulociták a kórokozókat bekebelezés után a fagoszomális térben különböző toxikus oxigénmetabolitokkal (pl. szuperoxid-anion, hipoklorit-anion) vagy hidrogén-peroxiddal pusztítják el.

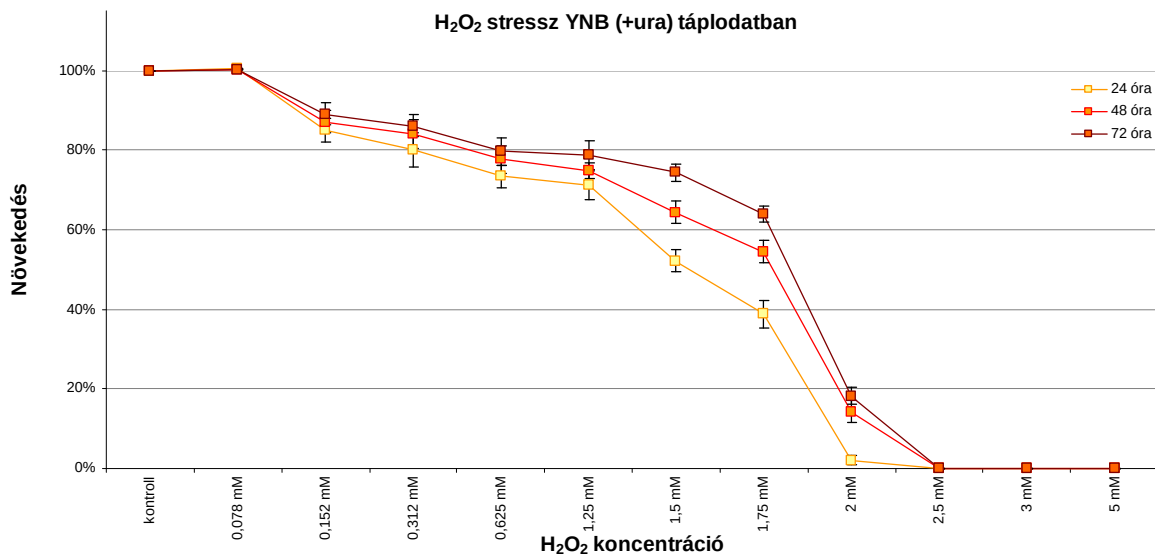
Ezekből a tényekből kiindulva, fontosnak találtuk megvizsgálni *in vitro* körülmények között a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz *R. oryzae* és *R. microsporus* növekedésére gyakorolt hatását. A vizsgálatokat, 96 mintahelyet tartalmazó mikrotiter lapra oltva hidrogén-peroxiddal kiegészített YEG és YNB (+ ura) tápoldatokban 10^5 sporangiospóra/ml koncentráció alkalmazásával végeztük. A növekedés gátlását a hidrogén-peroxid hiányában tapasztalt növekedéshez viszonyítva határoztuk meg.



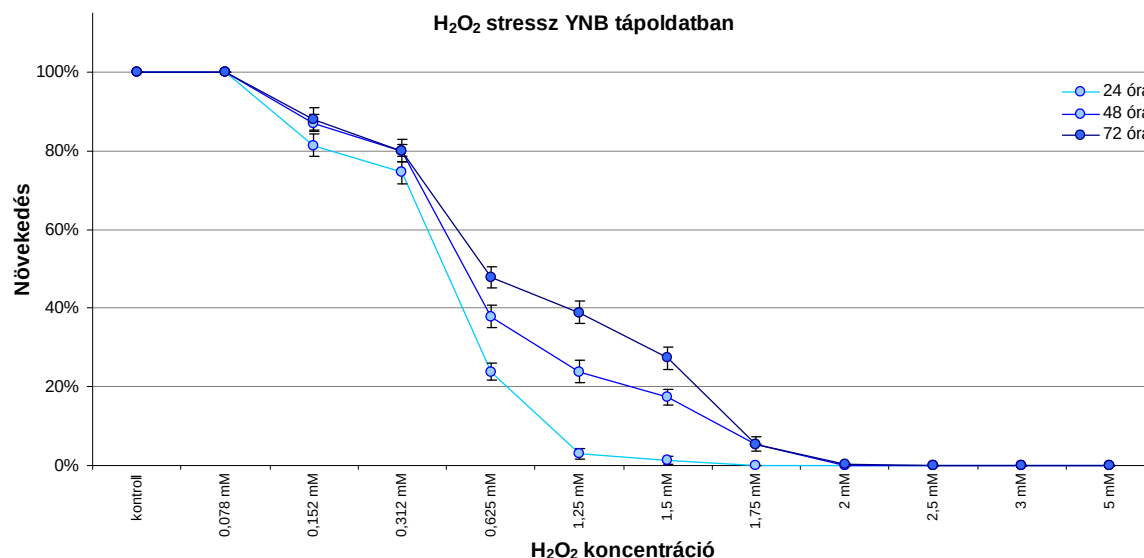
5. ábra: Különböző hidrogén-peroxid koncentrációk hatása a *R. oryzae* növekedésére YEG tápoldatban.



6. ábra: Különböző hidrogén-peroxid koncentrációk hatása a *R. microsporus* növekedésére YEG tápoldatban.



7. ábra: Különböző hidrogén-peroxid koncentrációk hatása a *R. oryzae* növekedésére YNB + ura tápoldatban.

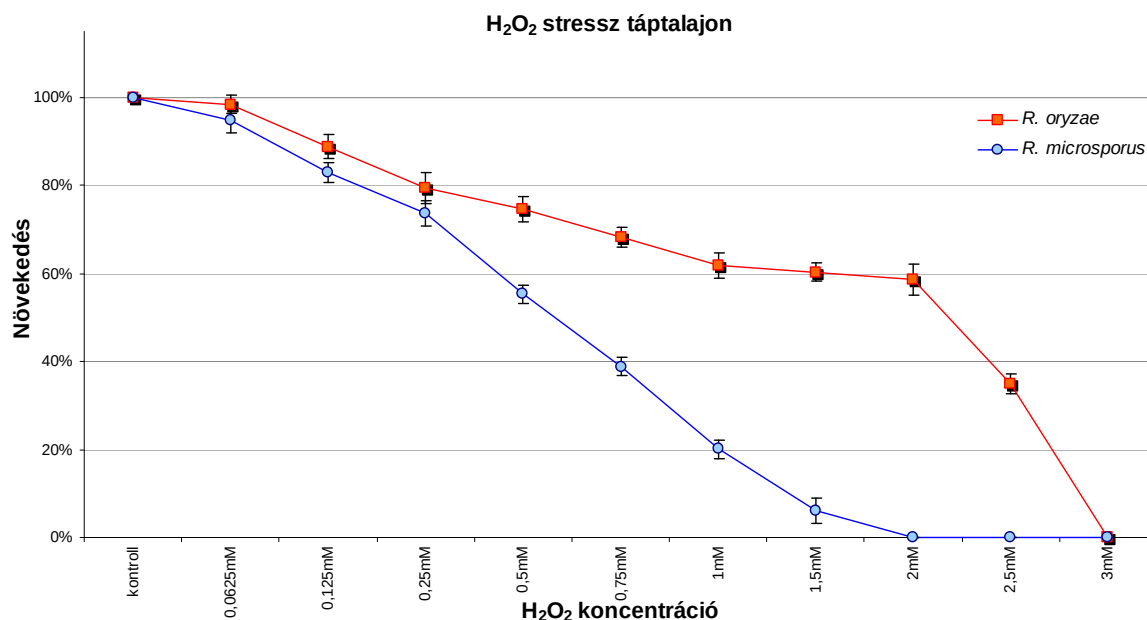


8. ábra: Különböző hidrogén-peroxid koncentrációk hatása a *R. microsporus* növekedésére YNB tápoldatban.

A kísérleteket három párhuzamosban végeztük el. A *R. oryzae* törzs esetében 24 órás tenyészetekben 1,5 mM hidrogén-peroxid jelenléte YEG és YNB + ura tápoldatban is 50% körüli növekedés gátlást eredményezett. A 1,5 mM feletti hidrogén-peroxid koncentráció mindkét tápoldatban történő tenyésztésnél már erőteljesen visszafogta a növekedést. A 1,5 mM alatti hidrogén-peroxid koncentrációk viszont csak kismértékben gátolták a gomba fejlődését. A *R. microsporus* törzs vizsgálatakor 24 órás tenyészetekben 1,5 mM-os hidrogén-peroxid koncentráció YEG tápoldatban 53%-os (6. ábra), YNB tápoldatban 99%-os növekedés gátlást okozott (8. ábra). Azonos hidrogén-peroxid koncentráció esetén, a *R. oryzae* törzshöz képest, YEG és YNB tápoldatban is, a *R. microsporus* törzs bizonyult érzékenyebbnek az oxidatív stressz hatásra. Mindkét törzs esetén a 48 és 72 órás mintáknál a növekedés mértéke erős hasonlóságot mutatott a 24 órás tenyészetek adott hidrogén-peroxid koncentrációjánál mért növekedési tendenciájával (5. – 8. ábra). A hidrogén-peroxid, gyorsan bomló tulajdonságára tekintettel, a tenyészetek fejlődésének korai szakaszában, a spóra csírázás gátlásában fejtett ki erőteljes hatást. (A különböző hidrogén-peroxid koncentrációk gombanövekedésre gyakorolt hatását százalékban kifejezve a 1. melléklet foglalja össze).

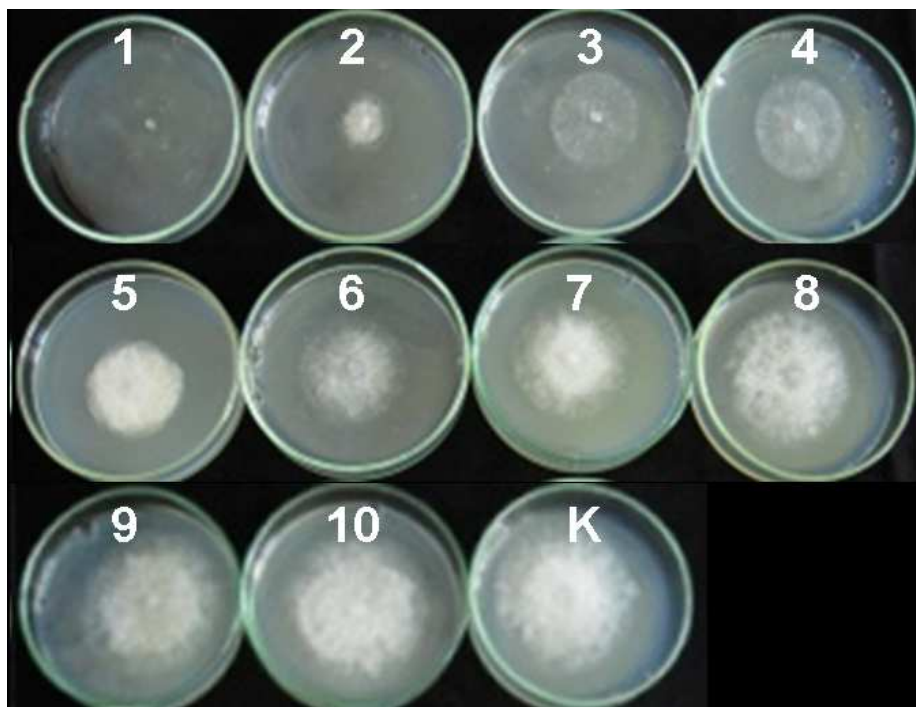
6.1.2. Hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz hatásának vizsgálata táptalajon

A hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz hatását *R. oryzae* és *R. microsporus* törzsekre a folyadék tenyészetek mellett szilárd tápközegben is (YNB + ura táptalajon) megvizsgáltuk. A hidrogén-peroxid érzékenység vizsgálata 90 mm átmérőjű Petri csészében történt. A szilárd táptalajon, 1,5 mM hidrogén-peroxid koncentráció mellett, mindkét törzs erőteljesebb növekedést mutatott, mint folyadék tenyészetben. A növekedéssel eltérésnek több oka is lehet. Oxidatív stressz folyékony közegben végzett vizsgálatoknál a sporangiospórák közvetlenül az adott hidrogén-peroxid koncentrációt tartalmazó tápoldatba kerültek, míg a szilárd táptalajon végzett vizsgálat esetében egy közvetett lépést iktattunk be. Híg spóra szuszpenziót készítettünk (10^1), azt *R. oryzae* esetén YNB + ura, *R. microsporus* esetén YNB táptalaj felszínére szélesztettük, majd a gombákat 12 órán keresztül 37 °C-on előtenyésztettük. A növekedésnek indult, egymástól jól elkülöníthető telepekből 3 mm átmérőjű telepdarabokat ültettünk a különböző hidrogén-peroxid koncentrációt tartalmazó csészékre. Így tudtuk biztosítani, hogy egy-egy csészén csak egy telep induljon növekedésnek. Ez a közvetett lépés eredményezhette a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stresszrel szembeni nagyobb fokú toleranciát, ugyanis itt már nem a sporangiospóra, hanem az aktívan csírázásnak indult telep lett oxidatív stresszhatásnak kitéve.



9. ábra: Különböző hidrogén-peroxid koncentrációk hatása a *R. oryzae* és *R. microsporus* növekedésére YNB és YNB +ura táptalajon.

A másik tényező, amely befolyásolhatta a növekedést adott hidrogén-peroxid koncentrációnál a két különböző közegben, hogy folyadék és szilárd táptalajban az oxidatív gyökök eltérő mennyiségben diffundáltak a telepek közelébe. A *R. oryzae* és a *R. microsporus* szilárd felületen végzett tenyésztésének diagrammját a 9. ábra mutatja be. A 10. ábrán lévő fotók a *R. oryzae* növekedését szemléltetik.



10. ábra: H_2O_2 által kiváltott oxidatív stressz hatásának vizsgálata YNB+ura táptalajon *R. oryzae* esetén.

H_2O_2 koncentrációk: 1: 3 mM; 2: 2,5 mM; 3: 2 mM; 4: 1,5 mM; 5: 1 mM;
6: 0,75 mM; 7: 0,5 mM; 8: 0,25 mM; 9: 0,125 mM;
10: 0,0625 mM; K: H_2O_2 -ot nem tartalmazott.

6.1.3. A spóra csírázás vizsgálata

A kataláz gének funkcionális jellemzésének kezdetén nem rendelkezünk információval a spórák csírázásának dinamikájáról. Ezért első lépésként meghatároztuk a spórák csírázásának idejét *R. oryzae* uracil auxotróf törzs esetén, hidrogén-peroxid jelenlétében és hiányában egyaránt. A kísérletben 1,5 mM-os hidrogén-peroxid koncentrációt alkalmaztunk, amelyet az oxidatív stressz kísérletekben tapasztalt 50%-os növekedés gátlása alapján választottunk ki. Óránként mintát gyűjtöttünk a tenyészetekből, majd mikroszkópos megfigyeléseket végeztünk.

A kísérletből megállapítottuk, hogy ha hidrogén-peroxid nincs a rendszerben, akkor a leoltást követő 3. órában legtöbb spóra a kiindulási méretéhez képest, kétszeres méretűre duzzad. Sok helyen a spóra külső burkának felrepedése volt megfigyelhető, néhol már a csíratömlő is megjelent. A leoltást követő 4. órában beindul a csíratömlő erőteljes képződése, 5 óra elteltével pedig a csíratömlő már két és félszerese volt a spóra méretének. A leoltást követő 6. órában már hifa elágazásokat is meg lehetett figyelni. A leoltástól számított 7. órában erőteljes volt a hifatömeg képzése.

1,5 mM hidrogén-peroxid jelenlétében a spórák csírázása lassabb volt. Ekkor a leoltástól számított 5. órában kezdődött meg a spórák erőteljes megduzzadása, és esetenként már meg lehetett figyelni, hogy felrepedt a külső spóra burok. A 6. órában kezdődött meg a csíratömlő képződés. A 7. órában lassú csíranövekedést lehetett megfigyelni (11. ábra).

11. ábra: *R. oryzae* spóra csírázásának dinamikája YEG, YEG + 1,5 mM H₂O₂ tápoldatban.

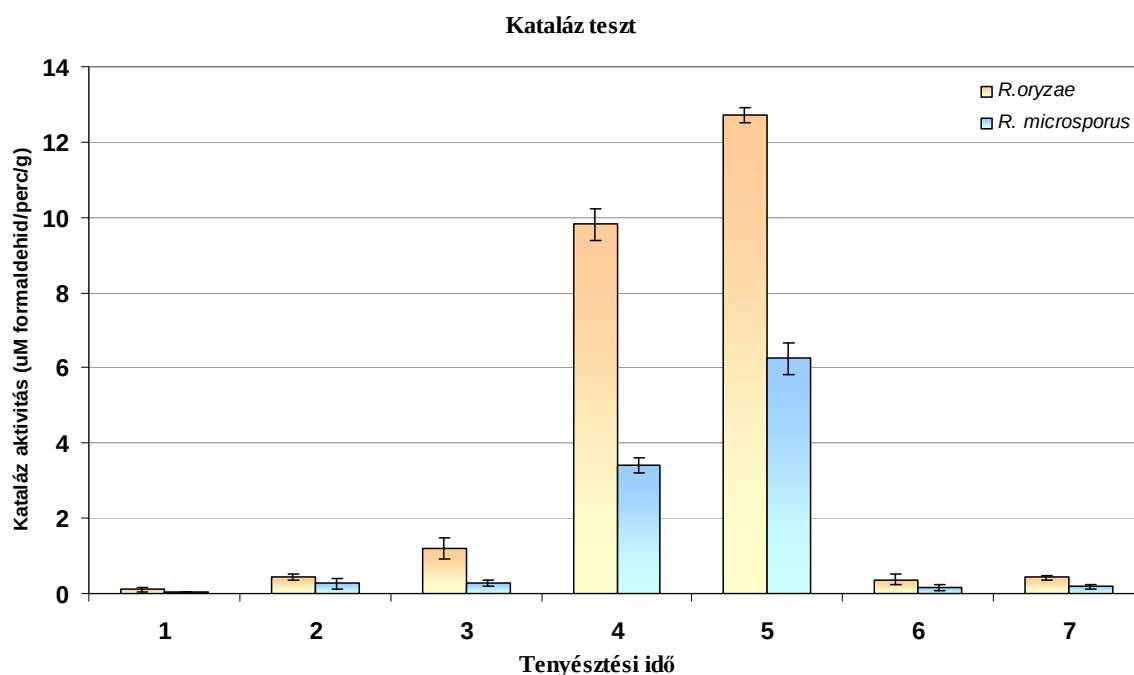
Nyíllal jelölve a csíratömlő képződés korai stádiuma. A méretarányt jelző vonal 10 µm-nek felel meg.

6.1.4. Katalázok aktivitásának meghatározása

Az egyes életszakaszokra jellemző össz-kataláz aktivitást kataláz teszt segítségével mértük meg ezáltal mennyiségi adatokat nyerve a különböző fejlődési stádiumokra jellemző össz-kataláz aktivitásáról.

A mintavétel időpontjainak kiválasztásakor a spóracsírázás dinamikájának meghatározása során kapott eredményeket vettük alapul. Első mintagyűjtési időpontnak a leoltástól számított 7. órát jelöltük ki, ekkorra már aktív hifaképződés figyelhető meg. Második és harmadik mintavételi időpontnak a leoltástól számított 24. és 48. órát

határoztuk meg. Az oxidatív stresszhatás mellett történő enzimaktivitás változás vizsgálatára a leoltástól számított 4. és 7. órát választottuk ki. A tenyészetek növesztése 1,5 mM hidrogén-peroxid jelenléte mellett történt. Megvizsgáltuk továbbá, hogy a gomba növekedésének egy későbbi szakaszában bekövetkező oxidatív stresszhatásra hogyan változik a kataláz fehérjék aktivitása. A leoltástól számított 7. órában adtunk 1,5 mM hidrogén-peroxidot a tenyészetekhez, amelyet tovább inkubáltuk, majd a hidrogén-peroxid hozzáadásától számított 30 és 60 perc elteltével mintát gyűjtöttünk. A mérésekhez kalibrációs görbét készítettünk formaldehid standard segítségével (2. melléklet).



12. ábra: Catalase Assay Kit-el mért össz-kataláz aktivitás.

Tenyésztési idők: **1:** 7 óra YEG tápoldatban; **2:** 24 óra YEG tápoldatban; **3:** 2 nap YEG tápoldatban; **4:** 4 óra YEG tápoldat, a leoltáskor kiegészítve 1,5 mM H₂O₂-dal; **5:** 7 óra YEG tápoldat, a leoltáskor kiegészítve 1,5 mM H₂O₂-dal; **6:** 7 óra YEG tápoldatban, majd 7 óra elteltével 1,5 mM H₂O₂-dal kiegészítve, tovább nevelve 30 percig; **7:** 7 óra YEG tápoldatban, majd 7 óra elteltével 1,5 mM H₂O₂-dal kiegészítve, tovább nevelve 1 órán keresztül.

A 7 órás mintában csekély aktivitás volt detektálható mindkét törzs esetén. A *R. oryzae*-ben mért kataláz aktivitás 70%-kal volt magasabb a *R. microsporus*-ban mért értékhez képest (12. ábra; tenyésztési idő: **1:** 7 óra YEG tápoldatban). A 7 órás mintákból származó értékekhez viszonyítva a következő aktivitás növekedések voltak megfigyelhetők: a *R. oryzae* esetén 1 napos mintában négyszeresére, 2 napos mintában

tizenkétszeresére, míg *R. microsporus* 1 napos mintában nyolcszorosára, 2 napos mintában kilencszeresére emelkedett a kataláz aktivitása (12. ábra; tenyésztési idő: **2**: 1 nap YEG tápoldatban; **3**: 2 nap YEG tápoldatban). A leoltáskor a tápoldathoz adott hidrogén-peroxid által okozott oxidatív stressz hatására erőteljes aktivitásnövekedés volt mérhető. Már a stresszhatást követő 4. órában *R. oryzae*-ben kilencvennyolcszorosára, *R. microsporus*-ban százöttszörösére növekedett a kataláz aktivitása (12. ábra. tenyésztési idő: **4**: 4 óra YEG tápoldat, a leoltáskor kiegészítve 1,5 mM H₂O₂-dal). A 7 óra oxidatív stressz hatására *R. oryzae*-ben százhuszonhétsszeresére, *R. microsporus*-ban kétszázszorosára emelkedett a kataláz aktivitás (12. ábra. tenyésztési idő: **5**: 7 óra YEG tápoldat, a leoltáskor kiegészítve 1,5 mM H₂O₂-dal). Abban az esetben, amikor az intenzíven növekedő hifát tettük ki hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stresszhatásnak, már egy órán belül intenzív kataláz aktivitás volt detektálható. A stresszt követő 30 perc elteltével *R. oryzae*-ben háromszorosára, 60 perc elteltével négyszeresére, *R. microsporus*-ban 30 perc elteltével ötszörösére, 60 perc elteltével hatszorosára emelkedett a kataláz aktivitás (12. ábra. tenyésztési idő: **6**: 7 óra YEG tápoldatban, majd 7 óra elteltével 1,5 mM H₂O₂-dal kiegészítve, tovább nevelve 30 percig; **7**: 7 óra YEG tápoldatban, majd 7 óra elteltével 1,5 mM H₂O₂-dal kiegészítve, tovább nevelve 1 órán keresztül).

A kataláz teszt által meghatározott értékek segítségével képet kaptunk a kataláz aktivitásokról egy-egy életszakaszra jellemzően. Ebben az esetben csak az össz-kataláz aktivitásról nyertünk információt az eltérő fejlődési fázisokra nézve. Szükségesnek láttuk további vizsgálatok elvégzését, amelyek által pontosabb képet kapunk a különböző kataláz gének aktivitásáról a gomba fejlődése során.

6.2. A kataláz gének szekvencia - és filogenetikai elemzése

6.2.1. A *Rhizopus oryzae* kataláz gének filogenetikai kapcsolatainak vizsgálata

További vizsgálataink célja volt a *R. oryzae* kataláz génjeinek filogenetikai analízise. Katalázt kódoló géneket több humánpatogén élesztő- és fonalgombából, illetve számos más organizmusból már azonosítottak és jellemeztek.

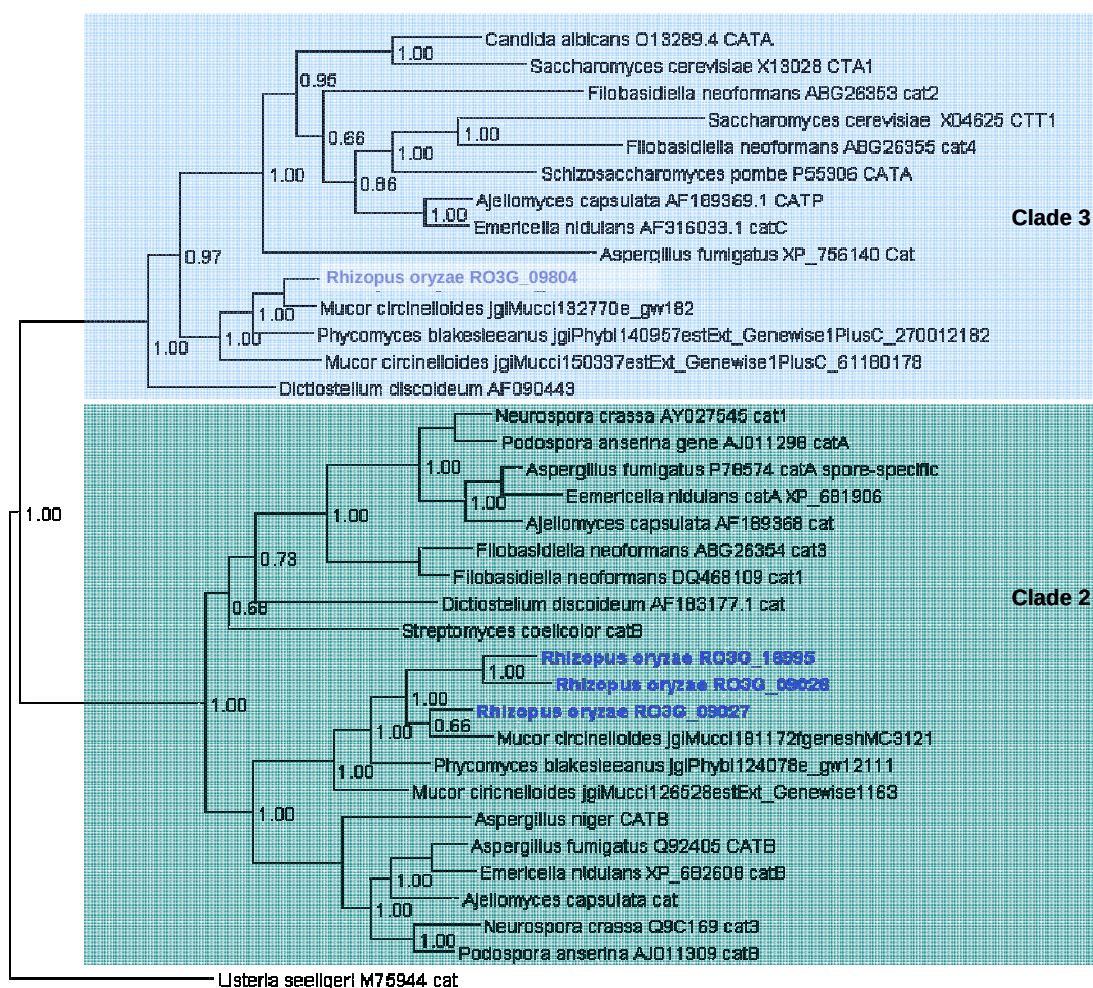
A filogenetikai elemzést az NCBI GenBank-ból letöltött monofunkcionális katalázok aminosav sorrendjével, valamint a *R. oryzae*, a *M. circinelloides* és a *Phycomyces blakesleeanus* genom adatbázisából letöltött, a monofunkciós katalázokkal homológiát mutató hipotetikus fehérjék szekvenciáival végeztük. A *R. oryzae* genom adatbázisban négy DNS szekvenciát találtunk, amelyek által kódolt fehérjék nagyfokú

hasonlóságot mutatnak más gomba monofunkcionális katalázokkal. Ezek a szekvenciák az adatbázisban a RO3G_9804.3, RO3G_09026.3, RO3G_09027.3 és RO3G_16995.3 azonosítókkal szerepelnek, mi a géneknek a *cat1*, *cat2*, *cat3* és *cat4* nevet adtuk.

Az aminosav szekvenciákkal filogenetikai elemzést végeztünk, a Bayes analízissel kapott 50% többségi konszenzus törzsfát a 13. ábra mutatja.

A törzsfa alapján, az *R. oryzae* genomadatbázisában található katalázok aminosav szekvenciái a KLOTZ és munkatársai (1997, 2003) által készített kataláz törzsfa hem tartalmú monofunkcionális katalázainak 2. és 3. kládjába (csoportjába) tartoznak. A *cat1* gén a 3. kládban, a kis alegység katalázok között foglal helyet és a peroxiszmális katalázokkal mutat nagy hasonlóságot.

A *cat2*, *cat3*, *cat4* gének a monofunkcionális katalázok 2. kládjába a nagy alegység katalázok közé illeszkednek be, mindhárom gén a törzsfán egymáshoz közel helyezkedik el.



13. ábra: A kataláz fehérjék aminosav sorrendje alapján Bayes analízissel nyert 50% többségi konszenzus törzsfa.

Korábbi vizsgálatok a *R. oryzae* esetében a teljes genom duplikációját állapították meg (MA és mtsi. 2009), melyet további génduplikációs események követtek. Vélhetően ezen génduplikációs események következtében alakultak ki hasonló funkciót betöltő, szekvenciában minimálisan eltérő gének, mint pl. kataláz gének. Hasonló génduplikációs folyamatokat más rokon nemzetségek esetében is megfigyeltek, illetve feltételeznek, pl. a *Mucor* nemzetségen belül 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A reduktázt (HMG-CoA) (LUKÁCS és mtsi. 2009) vagy glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt kódoló gének (RUIZ-ALBERT és mtsi. 2002).

6.2.2. A *Rhizopus oryzae* kataláz gének szekvencia elemzése

A négy kataláz gén jellemzőit az 5. táblázat, a szekvencia elemzéséből származó adatokat, a számított molekulatömeget, teoretikus izoelektromos pontot (pI), a molekulákon belül előforduló fontosabb motívumokat (pl: Hem prosztetikus csoport disztális, proximális oldala, tetrameriációs domén) a 6. táblázat foglalja össze.

Gén	Gén lókusza	Kromoszóma	Gén hossza (bp)	A kódoló régió hossza intronok nélkül (bp)	Intronok száma	Aminosav szekvencia hossza
<i>cat1</i>	RO3G_09804.3	6	1838	1455	6	484
<i>cat2</i>	RO3G_09026.3	3	2457	2133	6	710
<i>cat3</i>	RO3G_09027.3	3	2616	2157	6	718
<i>cat4</i>	RO3G_016995.3	nincs feltérképezve	2508	2133	5	710

5. táblázat: A négy kataláz gén szekvencia jellemzői.

KLOTZ és munkatársai kis és nagy alegység katalázok vizsgálata során megállapították, hogy a nagy alegység katalázokra jellemző egy peroxisómális szignál peptid, amely a peroxisómába szállítja a fehérje monomereket (KLOTZ és mtsi. 1997, KLOTZ és LOEWEN 2003).

Munkánk során, a CAT1 fehérje aminosav szekvenciájának vizsgálatakor találtunk egy három aminosavból álló (Ser-Lys-Ala) lehetséges a peroxisómába jutást irányító target szignált a fehérje C-terminális doménjén. E szignálpeptid által a fehérjének lehetősége van a bejutni a peroxisómába és ott funkciót ellátni (GOULD és mtsi. 1988). Az

általunk készített kataláz törzsfán, valamint a számított molekulatömeg alapján (monomer: 54,5 kDa) is a CAT1 fehérje a 3-as klád kis alegység katalázai közé tartozik. Ezek az eredmények meglepetésünkre szolgáltak, ugyanis az eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy elsősorban nagy alegység katalázok működnek peroxiszómális enzimként. Ugyanakkor azt is meg kell említeni, hogy a korábbi alaposabb domén elemzési vizsgálatok főképpen a nagy alegység katalázokra terjedtek ki. A monofunkcionális katalázok világa jelenleg is aktívan kutatott terület.

A CAT2, CAT3 és CAT4 fehérjék (monomer: 79-80 kDa) a 2. kládban, a nagy alegység katalázok között foglalnak helyet. A CAT3 fehérje elején található egy 20 aminosavból álló peptid, mely esetleges extracelluláris jellegre utal.

Fehérje	CAT1	CAT2	CAT3	CAT4
Számított monomer molekulatömeg (kDa)	54.564	80.130	81.232	79.658
Szignál peptid	-	-	1-20 aa	-
Teoretikus pI	7.07	6.05	5.53	6.14
C-terminális target szignál	482-484 aa	-	-	-
Hem prosztetikus csoport disztális oldala	H54, S93, V95, N127, F132	H72, S111, V113, N145, F150	H90, S129, V131, N-, F-	H72, S111, V113, N145, F150
Hem prosztetikus csoport proximális oldala	Y337, R344	Y359, R366	Y366, R373	Y359, R366
NADPH kötőhely disztális oldala	H173, R182, H214, H284	H195, R204, H236, H-	H202, R211, H343, H-	H195, R204, H236, H-
NADPH kötőhely proximális oldala	L421, L-, E-	L-, L449, E-	L-, L457, E-	L-, L449, E-
Tetramerizációs domén	1-50 aa	1-68 aa	21-86 aa	1-68 aa
Klád	3	2	2	2

6. táblázat: A négy kataláz fehérjében található motívumok.

A kis és nagy alegység katalázok többszörös szekvencia illesztésével megállapították, hogy a kataláz fehérjék szekvenciájában konzervált szerkezeti motívumok találhatóak, a hem prosztetikus csoport és a NADPH kötőhely disztális és proximális oldalán (ZAMOCKY és KOLLER 1999). Ezen eredmények alapján többszörös szekvencia illesztéssel a *R. oryzae* négy kataláz fehérjének szekvenciájában megtaláltuk a konzervált pozíciójú aminosavakat. A hem prosztetikus csoport proximális oldalán mind a négy

fehérje tartalmazza ezeket (6. táblázat; 14b. ábra), a disztális oldalon a CAT3 fehérjében hiányzik egy 11 aminosavból álló szakasz, amely a hem csoport működésében alapvető szerepet betöltő aminosavakat (Asn és Phe) tartalmaz (6. táblázat; 14a. ábra). A NADPH kötőhelyen mind a disztális, mind a proximális oldalon több funkcionálisan fontos aminosav hiányzik (6. táblázat; 14c-14d. ábra). A tetramerizációs domének eltérő hosszúságúak a négy kataláz fehérjében (6. táblázat; 3. melléklet).

a) Hem proszтетikus csoport disztális oldala

Bacsu	35_HLLEKLAHFNRERIPERVV	AKGAGAHGYFEVTNDVTKYTKAAFLSEVGKRTPLFIRF
Br-perox	35_LLLEKLAHFNRERIPERVV	ARGAGAYGTFTLTRDVSRTAAFLSEVGKRTETFLRF
Haein	44_WLNEKLADVFREVIPERRM	AKGSGAFGTFTVTHDITKYTRAKIFSEVGKKTEMFARF
Promi	35_WFLEKLAHFDREVIPERRM	AKGSGAFGTFTVTHDITKYTRAKIFSEVGKKTEMFARF
Rorycat1	35_HLVDKLAHFDREIRIPERVV	AKGAGAHGVFEVTNDITHLTAKAKFLSHVGKTPVFLRF
Bovin	55_VFTDEMAHFDREIRIPERVV	AKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRF
Rorycat2	53_VYREKMTDFDHERIPERVV	ARGFGVHGYFQTYKDWSQLTCANFLCHPSKKTTPVFVR
Rorycat4	55_AFREKITHFG - TIPERVV	ARGFGVHGYFQPYKDWSELTCAKFLCDPNKKTTPVFVR
Rorycat3	71_MMREKVMHFDHERIPERAV	ARGVAVHGYFQSYEDWSNITAAKFLQDPDTKTPVFVR
Aspng	86_IFRQKLQRFDERIPERVV	ARGAGAYGTFKSYADWSNVTAADFLSANDKETPMFCRF
EcoHPII	109_ILREKITHFDHERIPERIV	ARGSAAHGYFQPYKSLSDITKADFLSDPNKITPVFVR
Penja	45_LFTEIIFAFDRERIPERAV	ARGTGAHGTFLSYEDWSNLTAASFLSAEGKTPEMTRF
Arath	46_HLVEKLANFDRERIPERVV	ARGASAKGFFEVTHDISNLTCADFLRAPGVQTPVIVRF
Sacce_t	56_HLLENIASFDRERIPERVV	AKGGGCRLEFELTDSLSDITYAAPYQNVGYKCPGLVRF
Sacce_a	51_NLIDSLAHFNRENIPQRNP	AHGSAGFYFEVTDDITDICGSAMFSKIGKRTKCLTRF

Bacsu	94_T	AGELGSADTVRDPGRGFAVKFYTEEGNYDIVG	NTPV	FIRDAIKFPDFI - -HTQKRDPK
Br-perox	94_T	AGSLGAADAVRDPGRGALKFYTEEGNYDLVG	NTPV	FIKDAIKFPDFI - -HTQKRDPY
Haein	103_T	AGERGAADAERDIRGFALKFYTEEGNWDLVG	NTPV	FLRDPRKFPDLN - -KAVKRDPR
Promi	94_T	AGERGAADAERDIRGFALKFYTEEGNWDVVG	NTPV	YLRDPLKFPDLN - -HIVKRDPR
Rorycat1	94_T	GGEKGSADTARDPRGFAVKFYTEEGNWDVVG	NTPV	FIRDPSKFPDFI - -HTQKRNP
Bovin	114_T	AGESGSADTVRDPGRGFAVKFYTEDGNWDLVG	NTPV	FIRDALLFPSFI - -HSQKRNP
Rorycat2	112_T	LGNRGSPDCVRDVRGFATRFYDEGNFDLVG	VIAP	FVQDPSKFPDLI - -HAGKPEPD
Rorycat4	112_T	LGNRGSSDTVRDVRGFATRFYDEGNFDLVG	DVAP	FVQDAIKFPDLI - -HAAKPEPN
Rorycat3	130_T	LGSRGSPDTVRDVRGFATRFYDEGNWDL - - - - -		DAIKFPDLI - -HAAKPEPD
Aspng	145_T	VGFRGSVDTARDVHGHACRFYDEGNVDIVGINFAP		FIQDAIQFPDLV - -HAIKMPN
EcoHPII	168_T	QGAGSADTVRDIRGFATKFYTEEGIFDLVG	NTPV	FIQDAHKFPDFV - -HAVKPEPH
Penja	104_T	SGARGSADTARDVHGFATRFYVDEGNFDIVG	NIPV	FIWDVIEPTLMALHAQKPNR
Arath	105_T	IHERGSPETLRDPRGFAVKFYREGNFDLVG	NFPV	FIRDGMKFPDMV - -HALKPNPK
Sacce_t	115_T	GGESGTPDTARDPRGVSKFYTEWGNHDWVF	NTPV	FLRDAIKFPVFI - -HSQKRDPQ
Sacce_a	110_T	GGDKGSADTVRDPGRGFAVKFYTEEGNLDWVY	NTPV	FIRDPSKFPDFI - -HTQKRNPQ

b) Hem proszтетikus csoport proximális oldala

Bacsu	321_GIDVSPDKMLQGRLFA	HDAHRY	VG - ANHQALPIN
Br-perox	321_GIGPSPDKMLQGRLFA	GDAHRY	VG - INADHLPVN
Haein	330_GIGASPDRLQARLFN	ADAQRY	LG - VNYRQIPVN
Promi	321_GISFSPDKMLQGRLFS	GDAHRY	LG - VNHHQIPVN
Rorycat1	321_GIDVSPDRMLQGRLFS	PDTHRH	LG - VNYAQIPIN
Bovin	341_GIEPSPDKMLQGRLFA	PDTHRH	LG - PNYLQIPVN
Rorycat2	343_GIGFTDDPLLQGRIFS	IDTQIN	MNSVNFHQLPIN
Rorycat4	343_GIGITDDPLLQGRIFS	TDTQIN	MNSANYHQIPIN
Rorycat3	350-GITFTDDPLLQGRIFS	TDTQLN	MHSANYLQLPIN
Aspng	376_GIDFTDDPLLQGRIFS	LDTQLT	HGGPNFEQIPVN
EcoHPII	399_GLDFTNDPLLQGRIFS	TDTQIS	LGPNFHEIPIN
Penja	337_GVDFTEDPLLQGRIFS	LDTQLN	HG - PNIQQLGFN
Arath	332_GIHYSDDKLLQTRVFS	ADTQRH	LG - PNYLQIPVN
Sacce_t	366_GIKPSNDSVLQARLFS	PDTQRH	LG - ANYQQLPVN
Sacce_a	339_YQEASADPVLQARLFS	ADAHRY	LG - PNHFQIPVN

c) NADPH kötőhely disztális oldala

Bovin	184_FWSLRPES---	L	QVSFLFSD	GIPDGHHRMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKF	YKTDQG
Human	185_FWSLRPES---	L	QVSFLFSD	GIPDGHHRMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKF	YKTDQG
Rorycat1	164_FLSLPES---	I	QVTILFSN	GTPDGYRHLNGYSSHTLKLVDKGEFKYVVKF	FKTDQG
Promi	164_FFSHLPES---	L	QLTIDMSD	GLPLSYRFVHGFSGHTYSFINKDNERFVVKF	FRCQQG
Miclu	164_FWTNNPES---	A	QVTYLMGP	GLPRTWREMNGYGSHTYLWVNAQGEKHVVKY	FISQQG
Rorycat2	186_FFAQQPET---	T	TVLWVLSG	GTPKSFQVEGFGVNTFRLINEQGWVVKF	WKPLQG
Rorycat4	186_FFSRQPES---	I	TVLWALSG	GTPKSLRQVEGFGVHTMRLINEQKSVFVKF	WKPCQG
Rorycat3	193_FFSQHTET---	I	TVMWALSG	GTPRSFRQVEGFGVHTFRFINEDRKTVLVKF	WKPLQG
EcoHPII	242_YVSLQPET---	L	NVMWAMSD	GIPRSYRTMEGFGIHTFRLINAEGKATFVRF	WKPLAG
Sacce_a	180_FLTT-PENQVAI		QVMILFSD	GTPANYRSMHGYSGHTYKWSNKNGDWHYVQV	IKTDQG
Sacce_t	188_YLTLPES---	I	QITYMFGD	GTPASWASMNAYSGHFSFIMVNKEGKDTYVQF	VLSDTG

Bovin	293_FNPFDLTQVWP		GDYPLIPVGKLVNLRN
Human	294_FNPFDLTQVWP		KDYPLIPVGKLVNLRN
Rorycat1	272_FNPFDVTKVWS		KDYPLQPVGKLTNLRN
Promi	273_YNPFDLTQVWP		ADYPLMDVGYFELNRN
Miclu	2973_FNPFDLTKTISQ		KDYPRIKVGTLTNLRN
Rorycat2	295_FDILDATKIWPESI		IPVTILGKMVLNRT
Rorycat4	295_FDLLDSTKIVPESL		VPVTPGLKGMVLNLRN
Rorycat3	302_FDLLDATKIIPESL		VPVTKLGKMVLNLRN
EcoHPII	351_FDLLDPTKLIPEEL		VPVQRVGKMVLNLRN
Sacce_a	291_FSVFDLTQVWPQG		FPLRRVGKIVLNEN
Sacce_t	297_YSVNDLTKIWP		KEFPLRKFGTITLTEN

d) NADPH kötőhely proximális oldala

Bovin	422_THFSGDVQRFNSAND-----	DNVTQVRT	YLK	LN--E	QR
Human	423_IQYSGEVRRFNTAND-----	DNVTQVRA	YVN	LN--E	QR
Rorycat1	438_TTFTAEELEGVTGRH-----	SFTLTDDD	VQAGDL	--YRLM	
Promi	401_LSIEGAADHWNHREDE----	DYFSQPR	YEL	SD--D	HQ
Miclu	401-WEAVGVLTREAEALRAND---	NNFGEAGT	TRE	FS--N	ER
Rorycat2	422_GGYIEVPQKINGVKQ-----	RGKHGKKLEQQQ	VN--N	NFRF	
Rorycat4	422_GGYIEPPQRVNGIKQ-----	RGKHGKKLEQQQ	IN--N	NTRF	
Rorycat3	429_GGYLEYPENIRGRKQ-----	RGKHGKFAEQQ	VN--N	NFRF	
EcoHPII	482_FESYQERVEBNKVRERSPSFGEYYSHPRL	WLSQTP	--F	QR	
Sacce_a	433_EVWNGPAIPYHWATSPGD---	NNFGEAGT	TRE	FS--N	ER
Sacce_t	473_HIVDAKINQYVVYVGISP---	LDFEQPRA	YEK	YN--F	QK

14. ábra: A valódi katalázok és a négy *R. oryzae* kataláz hem posztetikus csoport és NADPH szekvencia alignmentje. A funkcionálisan fontos konzervált pozíciójú aminosavak fekete háttérrel jelölve.

6.3. A háromdimenziós szerkezet homológia-modellezése

A hipotetikus fehérjék valódi funkcióját háromdimenziós szerkezetük nagy valószínűséggel meghatározza, ezért ezek felderítése egyik fő célkitűzésünk volt. Tekintettel arra, hogy fontosságuk miatt számos kataláz szerkezetét meghatározták kísérletileg (köztük gombákét is), a szekvenciák ismeretében ez homológia-modellezéssel lehetséges. A minél realisabb szerkezeti modell eléréséhez homológia-modellezést és a szerkezet molekuladinamikai szimulációval történő finomítását együtt alkalmaztuk.

A *R. oryzae* genomadatbázisban négy kataláz homológ szakaszt találtunk. A gének aminosav sorrendjét egyesével az NCBI seblastp, pdb fehérje adatbankban lévő, pozíció specifikus PSI-BLAST algoritmus opció megválasztásával illesztettük. Ilyen keresési

opciókkal kapott rangsor alapján 43 kataláz fehérje szerkezete tűnt alkalmasnak homológia-modellezésre. A 43 kataláz fehérje score sorrendjét, a fehérjékben található hem csoportok típusát és a molekula felszínén található NADPH jelenlétét a 4. melléklet foglalja össze. Ezek közül BioEdit programmal végzett szekvencia összehasonlítás eredményeképpen 28 fehérjét választottunk ki a modellezés szempontjából redundánsnak tekinthető, egymástól csak pontmutációkban különböző *E. coli*-kból származó fehérjék elhagyásával (mind a négy *R. oryzae* kataláz gén esetében).

Az előzetes kísérletek alapján a *cat1* gén által kódolt fehérje szerepe tűnt meghatározónak. Ezen felül a *cat1* gén egy 484 aminosavból, a másik három kataláz gén pedig egy-egy több mint 700 aminosavból álló fehérjét kódol. A modellezéshez használható templát molekulák nagy részének mérete a 484 aminosavhoz áll közelebb. Ezek alapján a *cat1* gén által kódolt fehérjével kezdtük meg a molekulamodellezést. Mivel a négy gén közül ez áll a legkevesebb aminosavból, ez a molekula tűnt a legalkalmasabbnak a modellezéshez használt algoritmusok tökéletesítésére is. Az így megalkotott kiváló hatásfokkal működő algoritmusokat alkalmaztuk a továbbiakban a másik három fehérje háromdimenziós szerkezetének megalkotásához is. A dolgozatban a CAT1 fehérje modellezése során kapott szerkezetek segítségével szemléltetjük a háromdimenziós molekula modellezés lépéseit.

Az aktív forma, vagyis a homotetramer modellezéséhez felhasználandó szerkezeteket a monomerek modellezésével történő előszűréssel választottuk ki. A kizárólag fehérjeláncokkal történő illesztés sok esetben gyöngé modellt eredményezett, ezért a funkcionalitáshoz elengedhetetlen *hem* molekula jelenlétével, mint kényszerfeltétellel újból elvégeztük a modellépítést. Ezzel a módszerrel nagyszámú, *hem* nélkül rossznak bizonyult modell igen jó illeszkedést mutatott a templátokkal. A modellek tovább javultak, ha e mellett a meghatározott másodlagos szerkezetek (α -hélix, β -redő, szabályos kanyarszerkezetek) közé nem sorolható láncrészeket tovább finomítottuk. A számolt modellek minősítését a MODELLER programcsomag speciális moduljával („iterative_structural_align”) végeztük (CAT1 fehérje esetén: 7. táblázat, CAT2, CAT3 és CAT4 esetén: 5. melléklet). Ezt a BLAST szekvencia összehasonlítás alapján legjobbnak mutatózó 3RGP pdb kódú (*Bos taurus*) fehérje templáttal kapott modellekkel szemléltetjük.

15. ábra: A CAT1 és 3RGP pdb kódú fehérje monomerek illesztéséből kapott homológiamodellek. (Minden modell esetén a templát molekula piros színnel jelzett).

a: heteroatomok (hem) nélküli monomer homológiamodellje, **b:** heteroatomokkal (hem) való illesztéséből kapott monomer homológiamodellje; **c:** heteroatomokkal (hem) való loopmodellezéssel finomított monomer homológiamodellje; **d:** 1IPH_A pdb kódú *E.coli*-ből származó, 200 aminosavval hosszabb fehérjéhez történő CAT1 illesztés.

Látható, hogy a *hem* jelenlétével kapott modellben a *hem*-től távoli, külső fehérje láncrészek is a templátban megtalálható pozíciókba húzódnak (15b. ábra), összehasonlítva a *hem* nélkül kapott lényegesen fellazult szerkezettel (15a. ábra). A „loopmodel” modul alkalmazásával kapott modellben a másodlagos szerkezettel nem jellemezhető láncrészek tovább közeledtek a templát megfelelő szakaszaihoz (15c. ábra). Az „iterative_structural_align” modul a modellnek a templáthoz való illeszkedését 0-100-ig

terjedő skálán minősíti (7. táblázat). Az NCBI BLAST szekvencia összehasonlítás alapján legjobbnak mutatózó 3RGP pdb kódú (*Bos taurus*) fehérje a modul értékelése alapján loopmodellezés esetén is csak 97,33-as értéket kapott, míg a 1M85 és 3HB6 pdb kódú *Proteus mirabilis* fehérjék loopmodellezéssel 100-as értéket kaptak. A BLAST szekvencia illesztés alapján a magasabb rendű élőlényekből származó kataláz fehérjék, míg a modellezés során kapott háromdimenziós szerkezeteket tekintve az alacsonyabb rendű szervezetekben található kataláz fehérjék mutatnak a *R. oryzae* CAT1 fehérjével nagyobb fokú hasonlóságot. Klotz és munkatársai (1997, 2003) által végzett prokarióta és eukarióta katalázok rokonságát meghatározó filogenetikai analízis során, prokariótákból eukariótákba történő laterális géntranszfert feltételeztek, az általunk végzett háromdimenziós fehérje szerkezet illesztési eredmények ezzel összhangban vannak.

További munkánkhoz a kilenc legnagyobb illesztési értéket kapott fehérje szekvenciáit választottuk ki, ezek felhasználásával végeztük a CAT1 fehérje homotetramer megszerkesztését. A 15d. ábrán az 1IPH pdb kódú *E. coli*-ból származó, 200 aminosavval hosszabb fehérjéhez történő illesztés egyik esete látható. Bár a konzervált katalitikus domén modellezése kielégítő átfedéssel valósul meg, a pontosabb modellalkotás érdekében ezeket a hosszúláncú fehérjéket további munkánk során nem alkalmaztuk.

A fehérjeszerkezet minél realisabb modellje csak a négy lánc együttes illesztésével képzelhető el. A 16a. ábrán a négy azonos lánc egy templáton alapuló (pdb ID: 3RGP) együttes homológia-modellje látható. Nem kényszerítve a szimmetrikus elrendezést, szemmel láthatóan az egyes monomerek nem azonos mértékben illeszkednek a templát megfelelő monomerjeihez, ezért a MODELLER programcsomagban rendelkezésre álló szimmetria feltételt alkalmazva megismételtük a homológia-modellezést, amivel elértük, hogy a láncok azonos módon illeszkedtek a templát monomerjeihez (16b. ábra). A modellezést mindkét esetben a monomerenkénti *hem* molekulák jelenlétével és a „dopehr_loopmodel” loop modellező algoritmus alkalmazásával végeztük. Ezen tapasztalatok birtokában a végső modellt a MODELLER program rangsora alapján kilenc legjobbnak talált templáttal, együttes szekvencia illesztéssel (multiple alignment) induló homológia-modellezéssel hoztuk létre. Ezt szintén elvégeztük független láncokat feltételezve (16c. ábra) és a szimmetria feltételt alkalmazva (16d. ábra). A várakozásnak megfelelően a templát szerkezetével való legszorosabb egyezést ez utóbbi esetben kaptuk, amelyben a több templáton alapuló szekvenciaillesztés, mind a négy lánc együttes jelenléte, szimmetria feltétel, *hem* molekulák jelenléte és a loopmodellező algoritmus együttesen valósult meg.

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer + szimmetria		
					lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Purwar és mtsi. 2011.	1	3RGP_A	499	91,73	98,34	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Fita és Rossmann 1985.	2	7CAT_A	506	90,49	98,14	98,76	98,44	98,76	98,76	98,76	98,76	98,76
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Foroughi és mtsi. 2011.	3	3NWL_A	527	92,56	97,75	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	4	1DGH_A	498	93,38	98,55	98,76	98,655	98,65	98,655	98,65	98,65	98,65
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	5	1DGG_A	497	93,38	98,76	98,76	98,76	98,76	98,76	98,76	98,76	98,76
<i>Human erythrocyte</i>	Ko és mtsi. 2000.	6	1QQW_A	527	91,73	98,76	98,96	99,01	99,01	99,01	99,01	99,01	99,01
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	7	1DGH_B	498	93,38	98,55	98,76	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65	98,65
<i>Enterococcus. faecalis</i>	Frankenberg és mtsi. 2000.	8	1S18_A	484	94,93	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78
<i>Pichia angusta</i>	Penya-Soler és mtsi. 2011.	9	2XQ1_A	509	92,56	96,69	98,14	98,24	98,08	98,038	98,29	91,21	93,43
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004.	10	1QWL_A	505	91,73	95,24	99,79	99,79	99,79	99,79	99,79	99,79	99,79
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004	11	2A9E_A	505	91,11	93,59	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96	98,96
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	12	1H6N_A	484	91,78	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	13	1M85_A	484	92,42	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Vibrio salmonicida</i>	Riise és mtsi. 2007.	14	2ISA_A	483	91,47	99,16	99,58	99,58	99,58	99,58	99,58	99,58	99,58
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	15	1E93_A	484	92,42	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2009.	16	3HB6_A	484	92,64	99,15	100	100	100	100	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2001.	17	1H7K_A	483	92,21	99,15	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78	99,78
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MateÂ és mtsi. 1999b.	18	1A4E_A	488	97,72	97,52	98,76	98,76	98,65	98,76	98,70	98,76	98,76
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	Hara és mtsi. 2007.	19	2J2M_A	491	91,66	99,37	99,79	99,79	99,79	99,79	99,79	99,79	99,79
<i>Pseudomonas syringae</i>	Carpena és mtsi. 2003.	20	1M7S_A	484	91,94	97,1	98,14	97,925	97,925	97,92	98,03	98,08	97,92
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	21	1GWH_A	503	91,11	96,9	99,17	99,38	99,38	99,23	99,38	99,38	99,17
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 1992.	22	1HBZ_A	498	90,9	94,42	99,17	99,32	99,32	99,17	99,38	99,38	99,17
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	23	1GWF_A	503	89,25	90,7	98,14	98,34	98,34	98,445	98,34	98,34	98,39
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	24	3P9S_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	25	3P9R_A	754	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MateÂ és mtsi. 1999a.	26	1QF7_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	27	3P9P_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Bravo és mtsi. 1995.	28	1IPH_A	753	75,61	75,58	84,25	75,56	80,625	86,36	77,99	78,81	86,62
<i>Escherichia coli</i>	MateÂ és mtsi. 1999a.	29	1CF9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	30	1P81_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	31	1QWS_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	32	1GGK_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer + szimmetria		
					lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	33	1P7Z_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	34	1P80_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyán és mtsi. 2001.	35	1GG9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyán és mtsi. 2001.	36	1GGJ_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	37	1P7Y_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	38	3P9Q_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyán és mtsi. 2001.	39	1GGH_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2009.	40	3EJ6_A	688	81,61	83,88	93,38	88,38	89,92	93,5	89,87	89,66	94,26
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2004.	41	1SY7_A	715	84,5	88,84	94	87,80	89,87	92,198	88,16	89,46	92,76
<i>Penicillium janthinellum</i>	Borovik és mtsi. 2011.	42	2XF2_A	688	80,78	79,13	93,38	91,11	91,11	93,69	91,67	91,67	94,26
<i>Penicillium vitale</i>	Alfonso-Prieto és mtsi. 2007.	43	2IUF_A	688	77,89	77,89	92,97	90,38	90,38	93,12	90,07	90,07	94,15

7. táblázat: Az „iterative_structural_align” modul a modellnek a templáthoz való illeszkedését 0-100-ig terjedő skálán minősíti.

Pirossal jelölve a „iterative_structural_align” modul által legnagyobb értéket kapott fehérjék, ezek felhasználásával végeztük a CAT1 fehérje homotetramer megszerkesztését.

PDB: fehérje pdb kódja, **Monomer: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott monomer modell; **Monomer: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott monomer modell, **Monomer: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott monomer modell; **Tetramer: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell, **Tetramer: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott tetramer modell; **Tetramer: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell; **Tetramer + szimmetria: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel, **Tetramer + szimmetria: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel; **Tetramer + szimmetria: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel.

16. ábra: A CAT1 és 3RGP pdb kódú fehérje tetramerek illesztéséből kapott homológiamodellek. (Minden modell esetén a templát molekula piros színnel jelzett).

a: A négy azonos lánc egy templáton alapuló (3RGP) együttes homológiamodellje, szimmetria feltétel nélkül; **b:** A négy azonos lánc egy templáton alapuló (3RGP) együttes homológiamodellje, szimmetria feltétellel; **c:** 9 templát illesztésével, független láncokat feltételezve, szimmetria feltétel nélkül, homológiamodellezett fehérje; **d:** 9 templáton alapuló szekvenciaillesztés, mind a négy lánc együttes jelenléte, szimmetria feltétel, *hem* molekulák jelenléte és a loopmodellező algoritmus együttesen valósult meg.

Az így kapott, legrealisabbnak tekinthető molekula aktív centrumában (ami a *hem*-et körülvevő aminosavak együttesét jelenti) a kulcsfontosságú aminosavak pozíciója lényegében megegyezik a templát molekuláéval (pdb ID: 3RGP) (17a.-17b. ábra). A *R. oryzae* CAT2, CAT3 és CAT4 fehérje homológiamodelljei gyengébb SO értékkel voltak jellemezhetők a CAT1-hez viszonyítva. A 200 aminosavval rövidebb templát molekulákra

való illesztés során a loopmodellező algoritmus alkalmazása gyengébb modellt eredményezett, aminek valószínű oka, hogy a túlságosan hosszú templátszerkezet nélkül való szerkezet becslésre a MODELLER nem képes. Azt viszont fontos megjegyezni, hogy ezekben az esetekben a tetramer modellek SO értéke lényegesen jobb volt a monomer modellekénél. A CAT1 modellhez hasonlóan a szimmetria alkalmazásával javult a modellek hasonlósága. A 710-718 aminosav hosszúságú CAT2, CAT3 és CAT4 kataláz fehérjék homológia-modellezése csak három templát (pdb ID: 3EJ6, 1HBZ, 1GWF) esetében eredményezett hasonló javulást a modellek minőségében a különböző algoritmusok alkalmazása, mint ami a CAT1 esetében volt tapasztalható. A templát molekulák nagyrésze a 477-503 aminosav hosszúságú volt, csak az említett három templát fehérje esett a 689-736 aminosav hosszúságú tartományba.

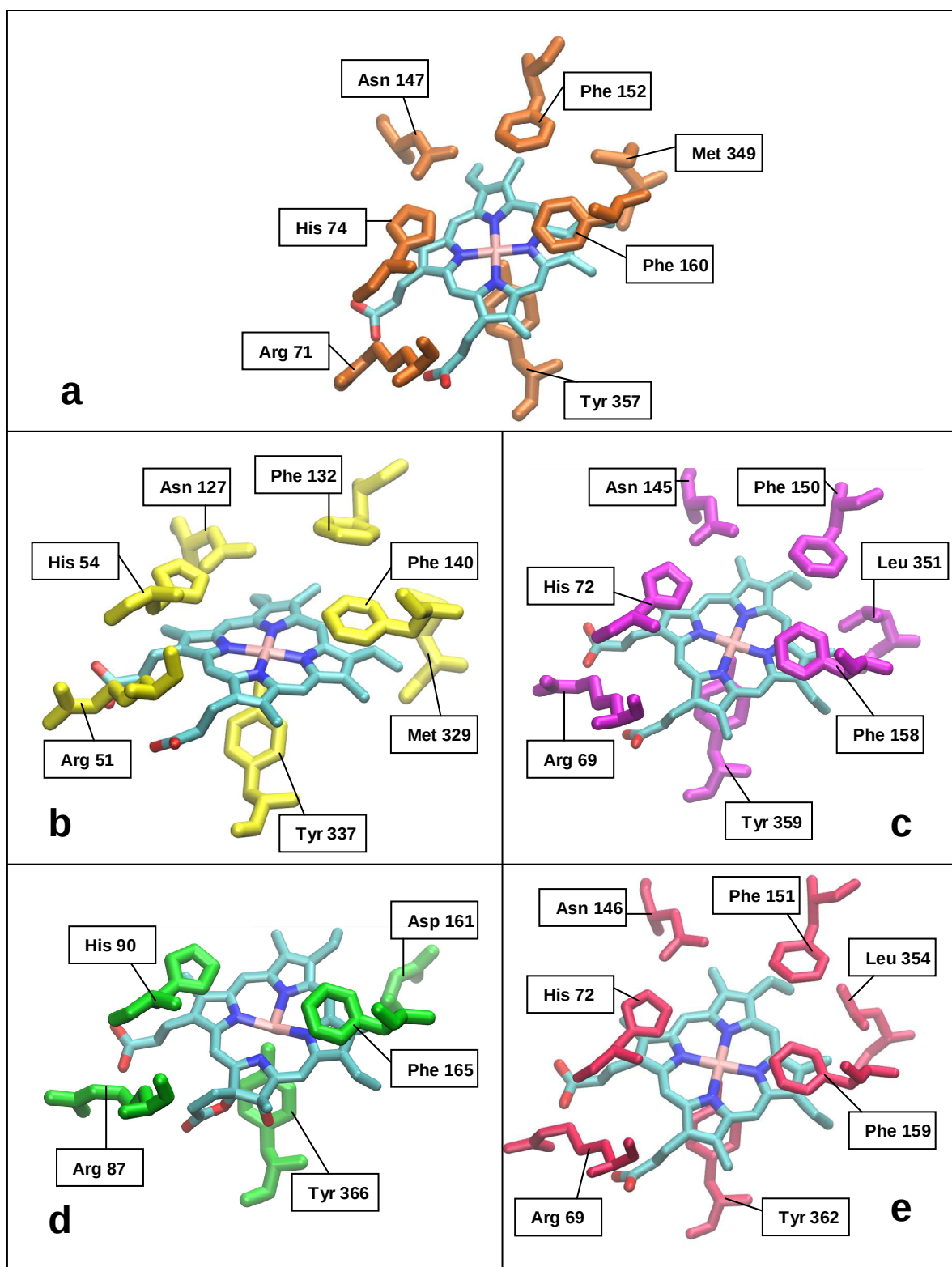
A molekulamodellezés legfontosabb eredményeit az aktív centrumok vizsgálatával kaptuk. A katalázok aktív centrumában elhelyezkedő aminosavak nagyfokú konzerváltsága figyelhető meg, így például a CAT4 modellek esetében az SO érték közel 100% volt, még akkor is, ha a templát molekula több mint 200 aminosavval rövidebb volt mint a modellezni kívánt fehérje (3. melléklet).

A modellezett fehérjékben a hem molekulák közvetlen környezetét a 17. ábra mutatja. A hem működéséhez kulcsfontosságú aminosavak a disztális oldalon lévő His és proximális oldali Tyr elhelyezkedése a Fe ion körül, Arg a hem karboxil csoportjai közé ékelődve, és négy hidrofób aminosav a hem gyűrű szemközti oldalán (Asn, Phe, Phe, Met). A CAT1 aminosav elrendeződése megegyezik a 3RGP aminosav elrendeződésével (15a.-17b. ábra). A CAT2 és CAT4 esetében Leu található a Met helyett (17c.-17e. ábra). A CAT3 esetében a hem körüli 11 aminosav hosszú fehérje szakasz hiányzik, ennek következtében a Asn és hozzá közelebb eső Phe hiányzik a hem prosztetikus csoport közeléből, Met helyett Asp található (17d. ábra).

A fehérjék háromdimenziós szerkezet összerendezése egy fontos eszköz a szerkezeti biológiában evolúciós és funkcionális rokonsági viszonyok megállapítására (WILSON és mtsi. 2009). Az „iterative_structural_align” erre a célra készült program, és mivel mi ezt használtuk a legmegfelelőbb templát kiválasztására, így egyúttal az evolúciósan legközelebbi katalázokat választottuk ki.

Ezek alapján a CAT1 és CAT4 fehérjék háromdimenziós szerkezete legnagyobb hasonlóságot a bakteriális katalázok szerkezetével mutatott, a templát molekulák hosszától

függetlenül, míg a CAT2 és CAT3 modellek kisebb hasonlóságot mutattak bakteriális katalázok szerkezetével és nagyobbat a gomba katalázokéval (5. melléklet).



17. ábra: A kataláz fehérjék aktív centruma. **a:** *B. taurus* (pdb ID: 3RGP), **b:** *R. oryzae* CAT1, **c:** *R. oryzae* CAT2, **d:** *R. oryzae* CAT3, **e:** *R. oryzae* CAT4.

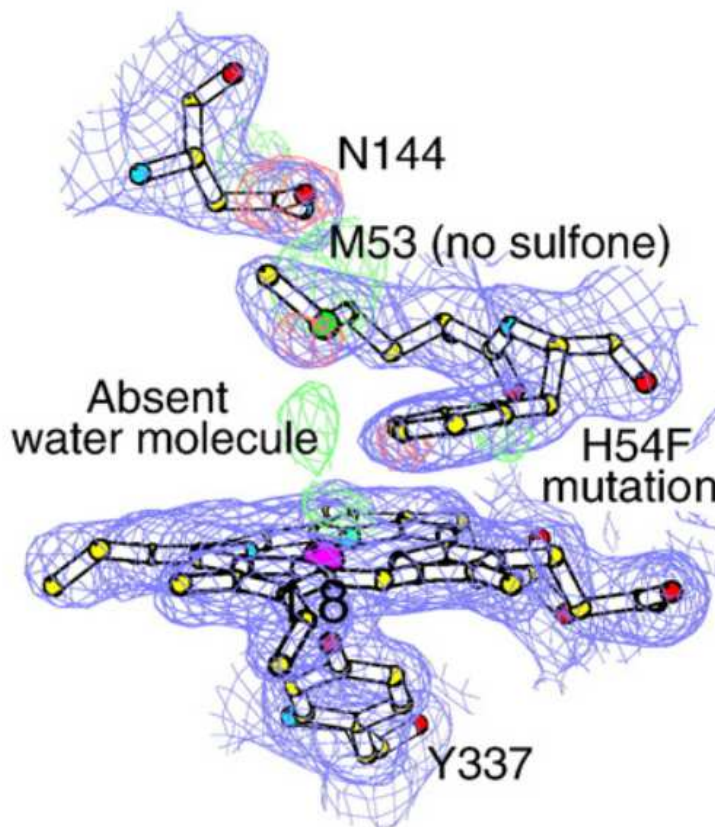
A 3-as klád kis-alegység katalázok közé sorolt CAT1 legnagyobb SO értéket (szerkezet azonossági értékek) (99% feletti), a baktériális katalázokkal mutatott. A CAT2 és CAT4 fehérjék a filogenetikai törzsfa 2-es kládjában testvércsoportot alkotnak. A CAT4 nagyobb SO értéket adott a bakteriális katalázokkal, és néhány gombával (csak kettő 99% feletti). Ezzel szemben a CAT2 SO-értéke 99% feletti hasonlóságot mutat a gomba katalázokkal. A CAT2 és CAT4 katalázok szekvencia illesztésekor 87%-os azonosság mutatkozott. A nagy alegység katalázok 2-es kládban található CAT3 a CAT2 és CAT4 párostól távolabb helyezkedik el, SO értéke 97%-os hasonlóságot mutat a *Penicillium* és *Neurospora* kataláz fehérjékkel.

Az SO értékek alapján a bakteriális katalázok szerkezetével észleltük a legnagyobb szerkezeti hasonlóságot, ebből arra lehet következtetni, hogy az ősi *R. oryzae* genomban csak a *cat1* és *cat4* gén volt jelen. Feltételezhetően a *cat2* gén a genom ősi duplikációja idején alakulhatott ki, a *cat4* megduplázódása által. A *cat1* gén sokkal rövidebb, mint *cat3*. Ez azzal magyarázható, hogy a *cat3* gén kialakulása a genom duplikációt követő további gén duplikációs események eredménye. A BLAST kereséssel a CAT1 fehérje aminosav sorrendje a magasabb rendű szervezetek katalázaival mutatott nagyobb hasonlóságot, míg a homológia-modellezés az alacsonyabb rendű szervezetek katalázaival talált nagyobb hasonlóságot. Ez összhangban van Klotz és mtsi. (1997) által feltételezett laterális gén transzferrel, amely prokariótákból az eukarióták irányába zajlott le (KLOTZ és mtsi. 1997 KLOTZ és LOEWEN 2003).

Andreoletti és mtsi. (2009) beszámolnak arról, hogy a *P. mirabilis* (pdb ID: 3HB6) kataláz fehérjéjében meghatározták azt az aminosavat, amely cseréjével a kataláz aktív centruma működésképtelenné válik, ez a His54. Ennek lecserélésével olyan kataláz fehérjét hoztak létre, amelyben az aktív centrum működése inaktiválódott a *hem d* környezet megváltozása következtében (18. ábra).

Az általunk végzett „iterative_structural_align” modullal történő számolás eredményeképpen a minősítési skálán a modellnek a templáthoz való illeszkedését vizsgálva 3HB6 pdk kódú *P. mirabilis* kataláz fehérje és a *R. oryzae* CAT1 fehérje 100-as értéket kapott. Ez azt jelenti, hogy a két fehérje háromdimenziós szerkezete, nagyfokú hasonlóságot mutat. Megvizsgáltuk a *P. mirabilis* kataláz fehérje aktív centrumát, összehasonlítottunk a *R. oryzae* CAT1 fehérje aktív centrumával és megállapítottuk, hogy jelen molekula esetében is megvalósítható lenne a hisztidin cseréje által a *hem d* környezet

azonos módosítása, melynek következtében a fehérje elveszíti kataláz aktivitását (17b. ábra).

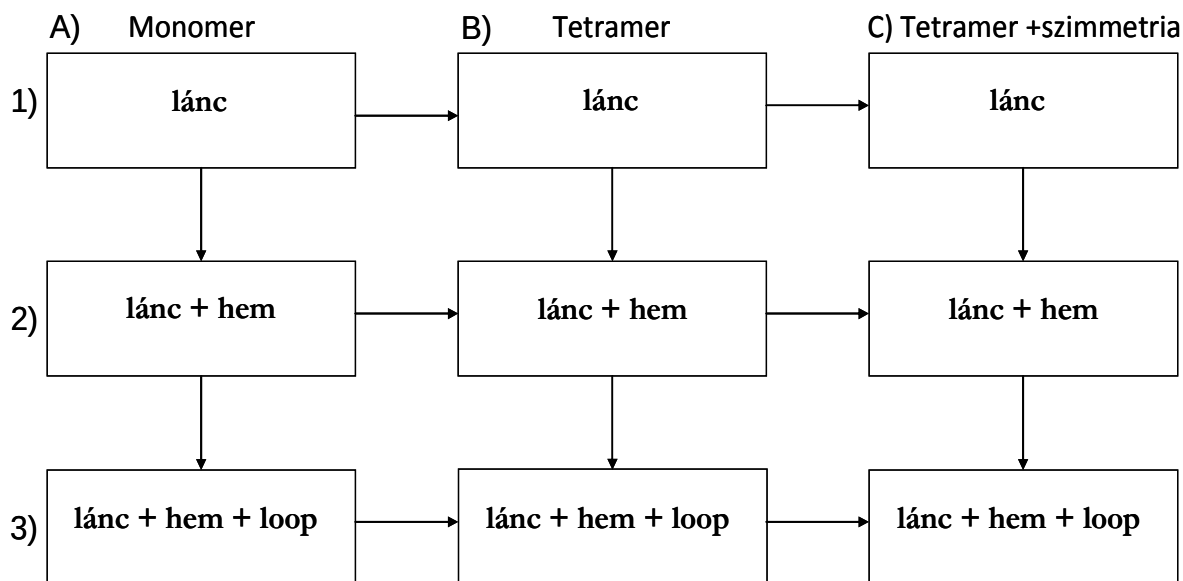


18. ábra: *Proteus mirabilis* (pdb: 3HB6_A) kataláz aktív centrumának inaktiválás *Hem d* környezet módosításával *His 54 (H54F)* mutáció által. (Andreoletti és mtsi. 2009).

A CAT1 fehérje homológia-modellezésével kapott háromdimenziós szerkezet jól megfelel a CAT1 fehérje szekvencia elemzésével kapott adatokkal. Mindkét módszerrel megállapítottuk, hogy a CAT1 fehérje aktív centruma a His54-et tartalmazza. Ezen eredmények alapján a távlati tervek között szerepelhet a kulcs aminosav His54 cseréjével megvalósuló *cat1* mutáns *R. oryzae* törzs létrehozása.

A háromdimenziós molekulamodellezés lépéseinek összefoglalása:

A kataláz fehérjék modellezése során alkalmazott lépések, melyek által lehető vált egy jó háromdimenziós modell megalkotása, mind a négy kataláz gén esetében a következők voltak (19. ábra):



19. ábra: Háromdimenziós molekulamedellezés lépései. A nyilak irányába a modell minőség javulása várható.

A: Monomer egységek szűrése a multitemplátos modellezéshez történő kiválasztáshoz:

- 1.: durva modell, csak a fehérjeszekvencia alapján (7. táblázat, 5-ös melléklet: lánc)
- 2.: finomított modell, a hem jelenlétével, mint kényszerfeltétellel (jelentős javulás) (7. táblázat, 5-ös melléklet: lánc + hem)
- 3.: további finomítás loopmedellezéssel (7. táblázat, 5-ös melléklet: lánc + hem + loop)

B: Tetramer modellezés a kiválasztott templátokkal:

- 1.: tetramer modell csak a fehérjeszekvencia alapján, a templátokkal egyenként (7. táblázat, 5-ös melléklet: lánc)
- 2.: tetramer modell hem jelenlétével (jelentős javulás) (7. táblázat, 5-ös melléklet: lánc + hem)
- 3.: tetramer modell további finomítása loopmedellezéssel (7. táblázat, 5-ös melléklet: lánc + hem + loop)
- 4.: tetramer modell további finomítása szimmetria feltétel (négy egyforma lánc) bevonásával (7. táblázat, 5-ös melléklet: lánc sym, lánc + hem sym, lánc + hem + loop + sym)

C: Végző tetramer modell az összes templáttal egyidejűleg, hem jelenlétével:

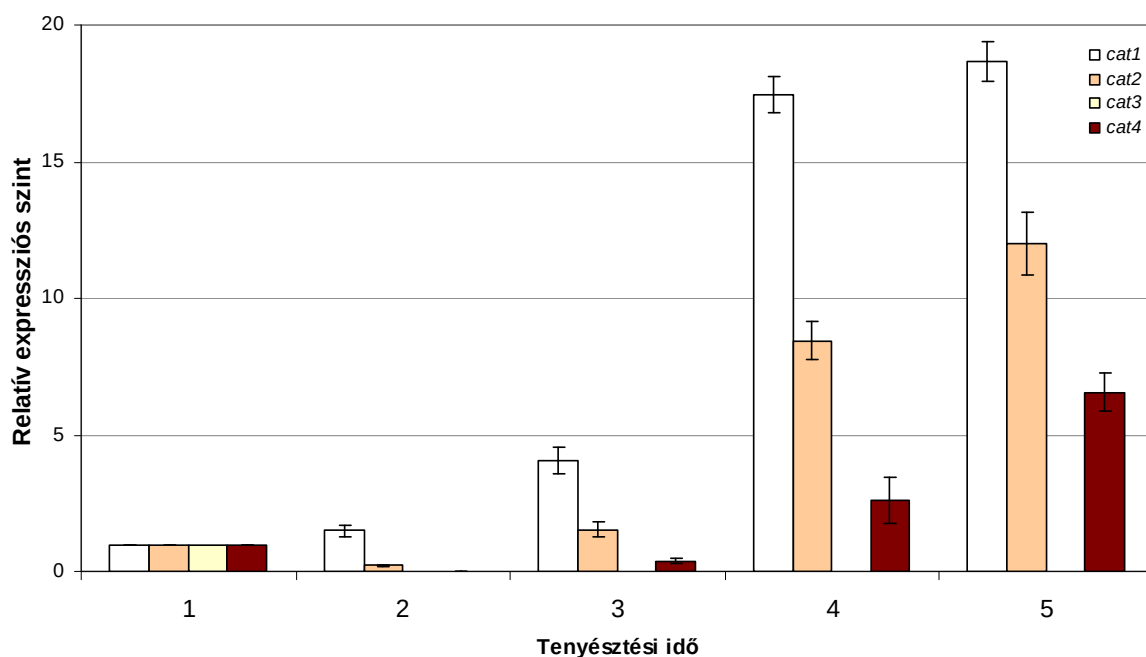
- 1.: loopmedellezéssel, szimmetria feltétel alkalmazásával (16d. ábra).

6.4. A kataláz gének kifejeződésének vizsgálata

6.4.1 A transzkripció vizsgálata

Vizsgáltuk a négy kataláz gén kifejeződését *R. oryzae*-ben eltérő tenyésztési körülmények között. A négy gén relatív transzkripció szintjének vizsgálatához a tenyésztéseket YEG tápközegben végeztük. A relatív transzkripció szintek meghatározásához belső kontrollként az aktin gént, biológiai kontrollként a négy kataláz gén 4 órás tenyészetéből származó aktivitási értékeit használtuk fel.

Meghatároztuk a kataláz gének aktivitását komplett tápoldatban (YEG) tenyésztett minták esetén. Az RNS kivonásokat a leoltástól számított 4. órában (a sporangiospórák csírázásának megindulásakor), a 7. órában (az erőteljes hifanövekedés kezdetén), valamint a fejlődés későbbi szakaszaiban, azaz az 1., 2. és 3. napon végeztünk (20. ábra).



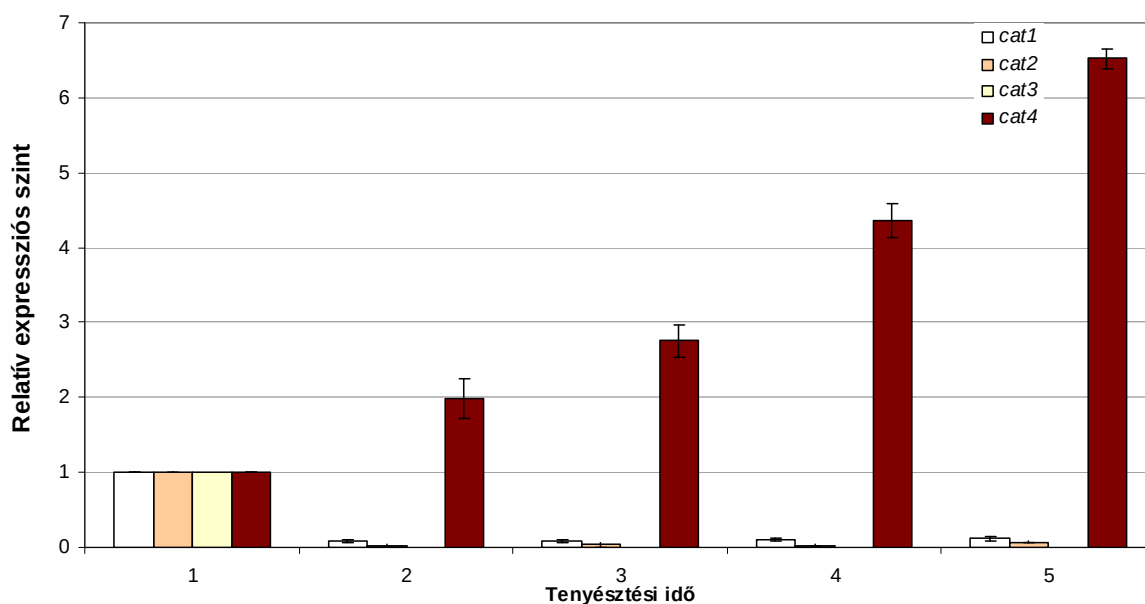
20. ábra: YEG tápoldatban nevelt *R. oryzae* kataláz génjeinek relatív transzkripció szintje.

Tenyésztési idő: 1: 4 óra (biológiai kontroll); 2: 7 óra; 3: 1 nap, 4: 2 nap; 5: 3nap.

Minden mintavételi időpontban a *cat1* gén aktivitása volt legmagasabb. A 7 órás tenyészetben a *cat1* és *cat2* gének aktivitása volt megfigyelhető. A további mintavételi időpontokban *cat1* gén mellett a *cat2* és *cat4* gén mutatott növekvő aktivitást. Mindhárom gén transzkripciója a 3. napon volt a legintenzívebb. A *cat1* gén transzkripciója minden mintavételi időpontban megközelítőleg kétszerese volt a *cat2* génnek, és három és félszerese a *cat4* génnek.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy oxidatív stressz hatására hogyan változik a kataláz gének expressziója a spórában és a micéliumban. A kísérlet során a tenyésztés 1,5 mM hidrogén-peroxidot tartalmazó YEG tápoldatban történt.

A spóra génaktivitás változásainak vizsgálatára az RNS kivonást a leoltástól számítva 10, 20, 30 és 60 perc elteltével végeztük (21. ábra).



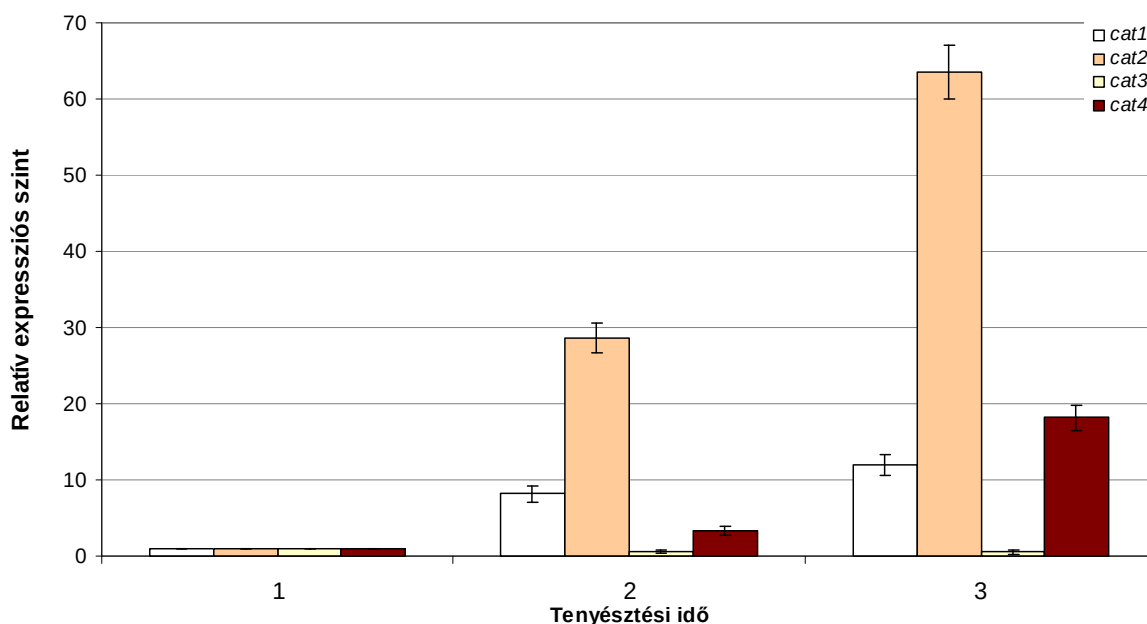
21. ábra: *R. oryzae* kataláz génjeinek relatív transzkripció szintje YEG + 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatban.

Tenyésztési idő: 1: 4 óra tenyésztés YEG tápoldatban (biológiai kontroll); **2:** 10 perc tenyésztés, YEG + 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatban; **3:** 20 perc tenyésztés, YEG + 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatban; **4:** 30 perc tenyésztés, YEG + 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatban; **5:** 60 perc tenyésztés, YEG + 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatban.

A spórára gyakorolt oxidatív stressz hatására minden mintavételi időpontban a *cat4* gén relatív expressziós szintje volt kiemelkedően magas. Már a leoltástól számított 10. percben erős transzkripció növekedés volt megfigyelhető, ami a későbbi mintavételi időpontokba tovább emelkedett.

A kataláz gének transzkripciójának változását a micéliumban oxidatív stressz hatására, a következő időpontokban vizsgáltuk: RNS kivonást a leoltástól számítva 4 óra, 7 óra elteltével végeztük (22. ábra). Minden mintavételi időpontban a *cat2* aktivitása mutatott kiemelkedő értéket, maximuma 7 óránál volt. A stressz hatás nélkül YEG tápoldatban tenyésztett 7 órás mintában mért aktivitáshoz képest közel háromszázszorosára nőtt a *cat2*

gén expressziós szintje. A *cat1* és *cat4* gének aktivitása is megnőtt a YEG tápoldatban stressz hatás nélkül nevelt tenyészetekhez képest. Ezek az aktivitások viszont jóval elmaradnak a *cat2* és *cat4* gének oxidatív stressz hatására kialakuló transzkripciós szint növekedéséhez képest. Az oxidatív stresszhatásnak kitett tenyészetek génexpressziós értéke minden mintavételi időpontban a YEG tápközegben nevelt tenyészetek génaktivitási értékeihez viszonyítva, jelentős mértékű növekedést mutatott.



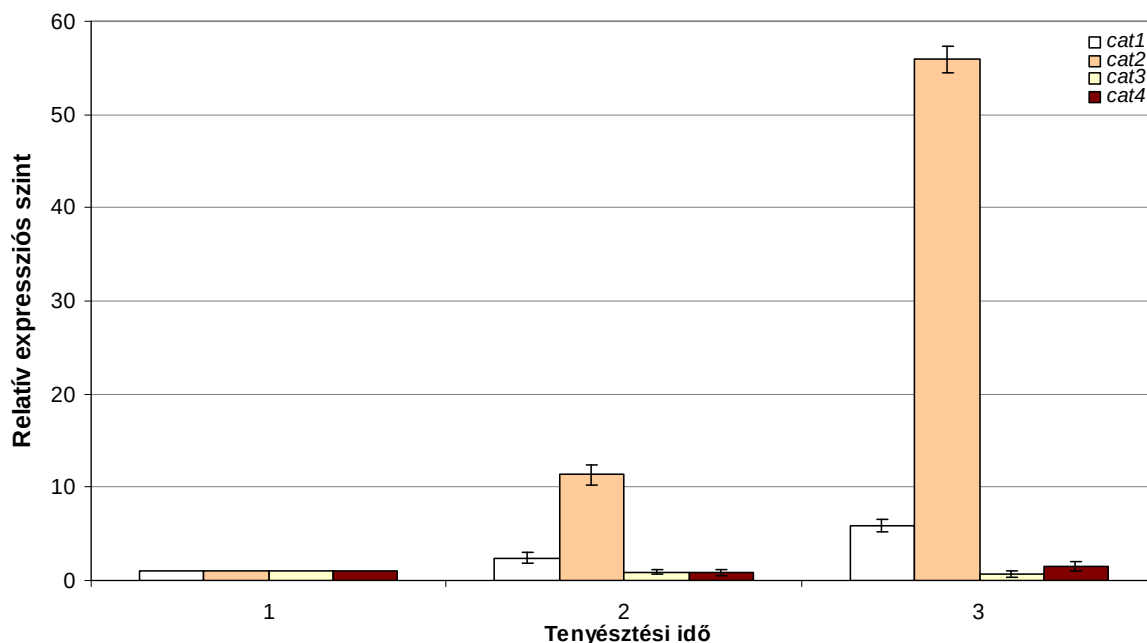
22. ábra: A négy kataláz gén relatív transzkripciós szintjei 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített YEG tápoldatban.

Tenyészési idő: 1: 4 óra tenyésztés YEG tápoldatban (biológiai kontroll); **2:** 4 óra tenyésztés, YEG + 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatban; **3:** 7 óra tenyésztés, YEG + 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített tápoldatban.

Szerettünk volna képet kapni arról is, hogy oxidatív stressz hatására milyen gyorsan és milyen mértékben változik a kataláz gének expressziós szintje. Kísérleteinket szilárd és folyadék tápközegben végeztük.

Leoltás után 4 órán keresztül tenyésztettük a törzset, ekkor kezdődik a spórák csírázása. A 4 órás tenyészethez hidrogén-peroxidot adtunk, majd 10 és 60 perc elteltével végeztünk RNS kivonást. A 4 órás mintából származó értékhez képest már 10 perccel a stresszhatást követően erőteljes expressziós érték növekedés volt detektálható, ami 60 perccel az oxidatív stresszt követően tovább nőtt (23. ábra). A kísérlet során a *cat2* gén expressziós szint változása volt a legerőteljesebb. A 4 órás tenyészetben mért értékhez

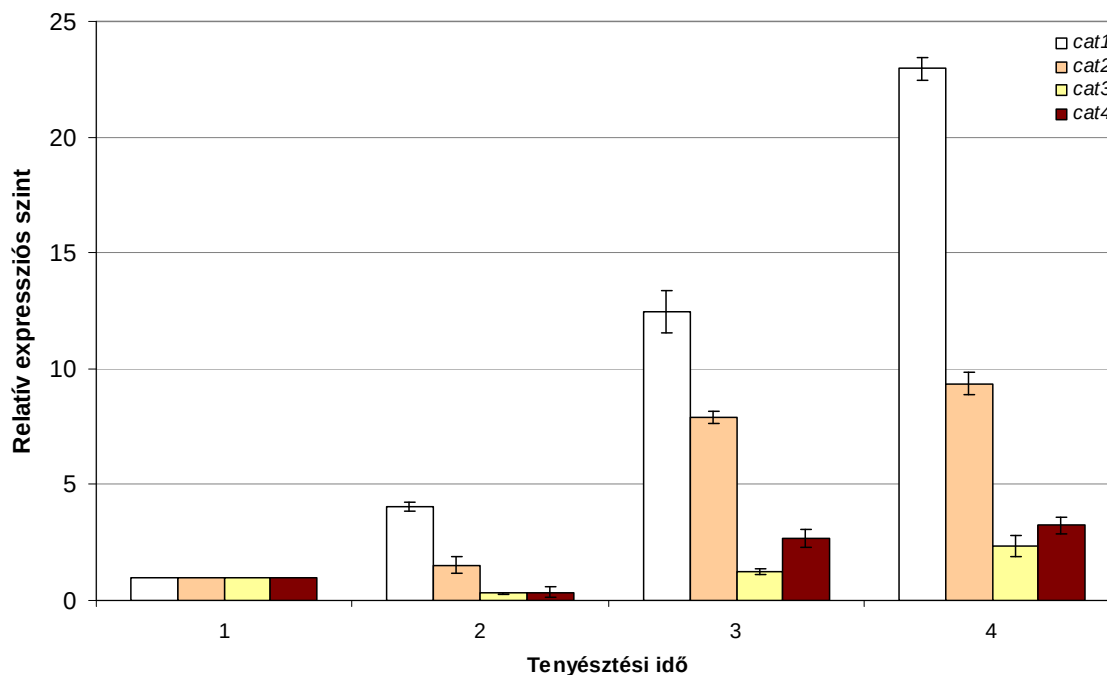
képest a *cat2* gén a stresszhatást követő 60. percben ötvenhatszorosára emelkedett. Ezt az aktivitást a *cat1* gén transzkripció szint emelkedése követte. A *cat1* gén aktivitása tizede volt a *cat2* gén aktivitásának. A *cat3* és *cat4* gének expressziós értékében is növekedés mutatkozott, ám ez az érték a *cat1* gén aktivitásának negyede volt.



23. ábra: YEG tápoldatban növesztett tenyészet kataláz génjeinek génexpresszió változása, 10 és 30 perccel a hidrogén-peroxid kezelés után.

Tenyésztési idő: 1: 4 óra tenyésztés, YEG tápoldatban (biológiai kontroll); **2:** 4 óra tenyésztés, YEG tápoldatban, RNS kivonás 10 percel a 1,5 mM hidrogén-peroxiddal való kezelés után; **3:** 4 óra tenyésztés, YEG tápoldatban, RNS kivonás 60 percel a 1,5 mM hidrogén-peroxiddal való kezelés után.

Szilárd táptalajon, 1 napos tenyészetben a micélium intenzív növekedése idején megvizsgáltuk az expressziós mintázatot. Majd a tenyészetre 1,5 mM töménységű hidrogén-peroxidot öntöttünk, 5, 15 és 30 perc elteltével mintát gyűjtöttünk. Már az oxidatív stresszhatás követő 5 percben elindult a *cat1* gén expressziós szint növekedése. Ami a 15. és 30. percben tovább nőtt. A *cat2* gén kisebb intenzitású aktivitásnövekedést mutatott, mint a *cat1* gén. A *cat1* gén huszonháromszorosára a *cat2* gén kilencszeresére a *cat3* és *cat4* gének a háromszorosára növekedtek a stresszhatást követő 30. percre (24. ábra). Ebben az esetben az 1 napos tenyészetből származó értékeket használtuk biológiai kontrollként.



24. ábra: YEG táptalajon növesztett tenyészet kataláz génjeinek génexpressziós szint változása, 5, 15 és 30 perccel a hidrogén-peroxid kezelés után.

Tenyésztési idő: 1: 1 nap tenyésztés YEG táptalajon (biológiai kontroll), **2:** 1 nap tenyésztés YEG táptalajon, RNS kivonás 5 perccel a 1,5 mM hidrogén-peroxiddal való kezelés után; **3:** 1 nap tenyésztés YEG táptalajon, RNS kivonás 15 perccel a 1,5 mM hidrogén-peroxiddal való kezelés után; **4:** 1 nap tenyésztés YEG táptalajon, RNS kivonás 30 perccel a 1,5 mM hidrogén-peroxiddal való kezelés után.

A kataláz gének transzkripció szint változásának vizsgálatát összegezve megállapíthatjuk, hogy a négy gén közül YEG tápoldatban a *cat1* gén fejeződik ki a legerősebben, amit a *cat2* gén aktivitása követ. Oxidatív stresszhatásra a spórában a *cat4* gén, micéliumban a *cat2* és *cat4* gének expressziós szintje emelkedik meg. A csírázás idején kialakuló stressz hatásra a *cat2* gén mutat legnagyobb expressziós szint növekedést, amit a *cat1* gén aktivitása követ. Az erőteljes fonalas növekedés idején az oxidatív stresszre a *cat1* és *cat2* gén expressziós szintje mutat intenzív emelkedést, a *cat3* és *cat4* gének esetében kis expressziós szint változás detektálható.

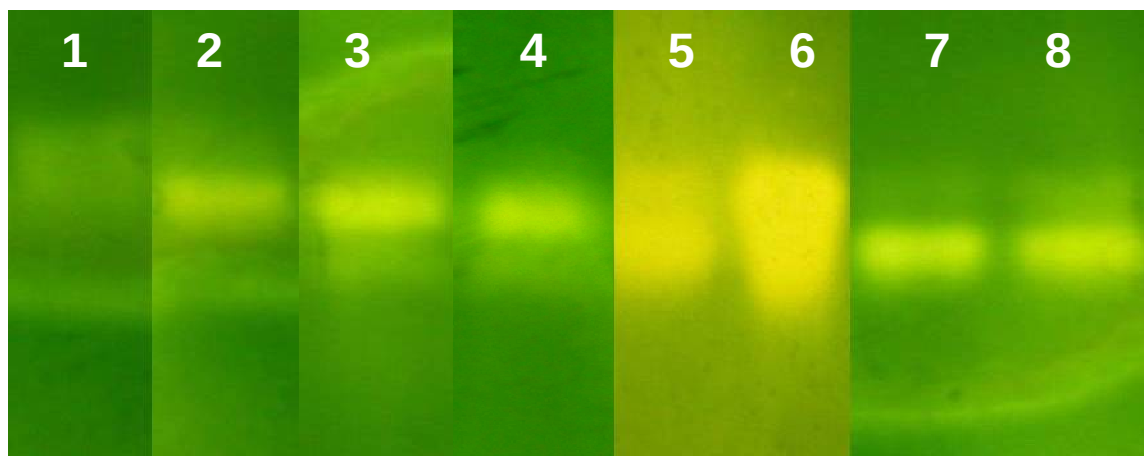
6.4.2. Izoenzim analízis

Tanulmányoztuk a kataláz fehérjék kifejeződését is. Ezen vizsgálataink során a *R. oryzae*-t YEG tápoldatban tenyésztve összfehérje kivonást végeztünk, majd a mintákat izoenzim analízissel vizsgáltuk. A mintavétel időpontjainak kiválasztásakor a spóracsírázás dinamikájának vizsgálatából és a kataláz tesztekéből származó eredményeket vettük alapul.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy izoenzim analízis segítségével kimutatható-e *R. oryzae*-ben a fejlődés korai szakaszában aktiválódó ún. spóra specifikus vagy korai katalázokat, valamint az erőteljes hifanövekedés beindulásakor változik-e a katalázok enzimmintázata. Első két mintagyűjtési időpontnak a leoltástól számított 4. és 7. órát jelöltük ki. A spórák erőteljes csírázása a leoltástól számított 4. órában indul be, a 7. órában már aktív hifaképződés figyelhető meg. Ezért úgy gondoltuk, hogy ezekben az időpontokban enzimaktivitás változásokat lehet majd megfigyelni. Harmadik mintavételi időpontnak a leoltástól számított 24. órát, a negyedik mintavételi időpontnak a tenyészet fejlődésének 48. óráját határoztuk meg. Ezekben a mintákban az ún. késői vagy micéliális katalázok aktivitását kívántuk azonosítani.

A szakirodalomból jól ismert, hogy vannak olyan kataláz gének, amelyek a stresszhatások kivédésében játszanak szerepet, oxidatív stressz hatására mutatnak erőteljesebb aktivitásnövekedést, míg más gének a fejlődés késői fázisában aktiválódnak, pl. éhezés, vagy hőmérsékletnövekedés hatására (KAWASAKI és AGUIRRE 2001). Ezek alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy 1,5 mM hidrogén-peroxid jelenléte által kiváltott oxidatív stresszhatásra hogyan változik a katalázok enzimaktivitása. A tenyésztés 1,5 mM hidrogén-peroxiddal kiegészített YEG tápoldatban történt, a leoltástól számított 4. és 7. órában gyűjtöttünk mintát. Valamint a gomba növekedésének egy későbbi szakaszában a leoltástól számított 7. órában adtunk 1,5 mM hidrogén-peroxidot a rendszerhez, majd a hidrogén-peroxid hozzáadásától számított 30 és 60 perc elteltével mintát gyűjtöttünk. Az izoenzim analízis eredménye a 25. ábrán látható.

YEG tápoldatban optimális körülmények között tenyésztve a fejlődés korai szakaszában gyenge kataláz aktivitás volt megfigyelhető. A leoltástól számított 4. órában gyűjtött mintában (25. ábra, 1-es minta) kis mértékű enzimaktivitást detektáltunk. A 7 órás (25. ábra, 2-es minta) tenyészetben már fokozódott a katalázok aktivitása a 4 órás tenyészetből származó mintához viszonyítva. Az 1 napos és 2 napos mintákban (25. ábra, 3-as, 4-es minta) tovább nőtt az enzimaktivitás. A hidrogén-peroxid hozzáadása után 4 és 7 órával gyűjtött mintákban (25. ábra, 5-ös, 6-os minta) erőteljes enzimaktivitás volt látható, a gélen a sávok egybemosódtak. A 7-es és 8-as mintában rövid idejű hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz hatására némi fehérje aktivitásfokozódás volt észlelhető. Az összes minta tekintetében oxidatív stressz hatást követő 7. órában volt legerősebb enzimaktivitás megfigyelhető.



25. ábra: Izoenzim analízis különböző körülmények között nevelt tenyészetekből.

Mintasorrend: **1:** 4 óra YEG tápoldatban, **2:** 7 óra YEG tápoldatban, **3:** 1 nap YEG tápoldatban, **4:** 2 nap YEG tápoldatban, **5:** 4 óra YEG + 1,5 mM H_2O_2 tápoldatban, **6:** 7 óra YEG + 1,5 mM H_2O_2 tápoldatban, **7:** 7 óra YEG tápoldatban, majd 7 óra elteltével 1,5 mM H_2O_2 -dal kiegészítve, tovább nevelve 30 percig; **8:** 7 óra YEG tápoldatban, majd 7 óra elteltével 1,5 mM H_2O_2 -dal kiegészítve, tovább nevelve 1 órán keresztül.

Az izoenzim analízis során minden minta esetében két sávot detektáltunk. A sávok eltérő intenzitással jelentek meg a gélen, az eltérő enzim mennyiségeket jelezve.

Oxidatív stresszhatásra a fehérjék átírása gyorsan elindul (25. ábra, 7-es és 8-as minta) és nagy mennyiségben jelennek meg a sejten belül, ezt láthattuk 4 és 7 óra stresszhatás mellett történő tenyésztés esetén (25. ábra, 5-ös és 6-os minta).

6.5. Állatkísérletek

Munkánk során lehetőségünk nyílt állatmodellben vizsgálni a *R. oryzae* és *R. microsporus* által okozott mikózis lefolyását. Ez a kísérlet, előkísérletként szolgált, amelyben a vad törzsek által kialakított mikózis lefolyásáról kaptunk képet, továbbá az állatkísérleti rendszert optimalizáltuk. Terveink között szerepel kataláz deléciós mutáns törzseket készíteni és ezekkel is lefolytatni a kísérleteket, katalázok patogenitásban betöltött szerepét vizsgálva.

A járomspórás gombákról tudjuk, hogy nem virulens szervezetek, ezért az általuk kiváltott mikózisok lezajlásának elemzésére a kísérlet megkezdése előtt a modell-szervezetekben a fertőzés kialakulásához szükséges feltételeket meg kellett teremteni (immunszuppresszió). A szakirodalom alapján az *R. oryzae* esetén deferexaminnal és sztreptozocinnal váltottak ki immunszuppressziót egér modellben (IBRAHIM és mtsi. 2007).

6.5.1. Immunszuppresszió, infekció

A kísérleti állatok immunszuppresszióját az irodalmi adatok alapján meghatározott koncentrációjú (200 mg/kg) ciklofoszfamid három napon keresztül intraperitoneális (ip.) oltásával váltottuk ki. A kísérletben résztvevő összes egyed testsúlyát naponta mértük és feljegyeztük. Az immunszuppresszált csoportba tartozó egerek súlya átlagosan 3 g-os visszaesést mutatott a kiindulási súlyukhoz képest. A kontroll állatcsoportokéhoz viszonyítva az immunszuppresszált egyedek táplálkozási kedve visszaesett.

A nulladik napon inhalációs módszerrel fertőztük az állatokat (10^5 spóra/25 μ l/egér). A fertőzést *R. oryzae* uracil auxotróf törzsének, valamint *R. microsporus* vad típusú törzsének sporangiospóráival hajtottuk végre. A sporangiospórákat 3 napos tenyészetekről mostuk le, Bürker-kamra segítségével állítottuk be a kívánt spóraszámot. A kontroll egér csoport, amelynél nem alakítottunk ki immunszuppressziót *R. oryzae* uracil auxotróf törzsével lett fertőzve. Kísérlet során egy abszolút kontroll csoportot is alkalmaztunk, amelyet PBS pufferrel oltottunk intraperitoneálisan, infekció során spóraszuszpenzió helyett 25 μ l PBS puffert inhaláltattunk (spórával nem lett fertőzve). Az egyes kísérleti csoportokra vonatkozó immunszuppresszió és a fertőzés kiváltását a 8. táblázat foglalja össze.

Gomba törzs / egér csoport	Kezelés			Fertőzés napja	Kezelés
	ciklofoszfamid / PBS				ciklofoszfamid / PBS
	-3 nap	-2 nap	-1 nap		+1 nap
<i>R. oryzae</i> / i.s.	+/-	+/-	+/-	<i>R. oryzae</i> 10 ⁵ spóra/25 µl	+/-
<i>R. microsporus</i> / i.s.	+/-	+/-	+/-	<i>R. microsporus</i> 10 ⁵ spóra/25 µl	+/-
<i>R. oryzae</i> / nem i.s.	-/+	-/+	-/+	<i>R. oryzae</i> 10 ⁵ spóra/25 µl	-/+
PBS / nem i.s.	-/+	-/+	-/+	PBS/25 µl	-/+

8. táblázat: Immunszuppresszió és a fertőzés menete.

R. oryzae / i.s.: *R. oryzae* törzsszel fertőzött csoport / immunszuppresszált;

R. microsporus / i.s.: *R. microsporus* törzsszel fertőzött csoport / immunszuppresszált;

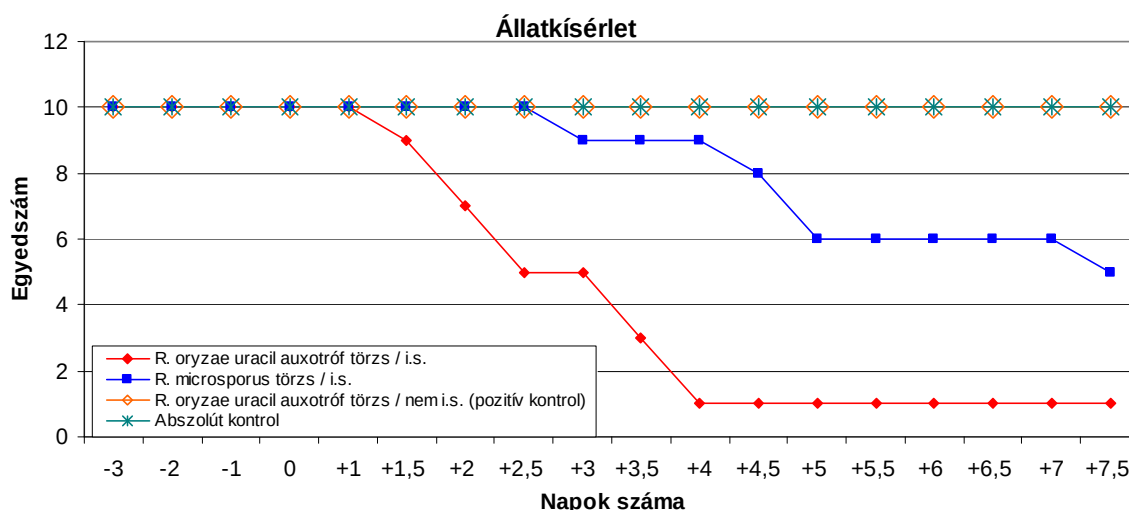
R. oryzae / nem i.s.: Kontroll csoport *R. oryzae* uracil auxotróf törzsszel fertőzve - nem immunszuppresszált;

PBS / nem i.s.: abszolút kontrollcsoport, nem immunszuppresszált, spórával nem lett fertőzve;

i.s.: immunszuppresszált; nem i.s.: nem immunszuppresszált; PBS: foszfát puffer.

6.5.2. A mikózis lefolyása

A fertőzést követően is folyamatosan nyomon követtük az állatok súlyát. Az infekció után az esetleges invázió külső tüneteit egyedenként feljegyeztük. Azoknál az egyedeknél, amelyekben sikeresen váltottunk ki mikózist, a betegségre utaló tünetek szemmel is jól láthatóak volt. Szőrük borzas volt, egyre inkább gubbasztó magatartást vettek fel, némely egyednél szemgyulladás jelei mutatkoztak, zihálóvá vált a légzésük, légzési hangjuk sípoló lett, folyamatos és nagymértékű súlyvesztés lépett fel. Az ilyen tüneteket mutató egyedeket fokozottabb megfigyelés alá vontuk, hogy a halál beállta után azonnal megkezdhessük a szerveik vizsgálatát. A fertőzést követő két hétben folytak a megfigyelések, a fertőzés napjától számított 8. napon túl már nem következett be újabb elhullás. Az egyes fertőzési csoportok elhullási dinamikáját és mértékét a 9. táblázat és 26. ábra mutatja be.



26. ábra: Az egyes kísérleti csoportok elhullási dinamikájának és mértékének diagrammja.

***R. oryzae* / i.s.:** *R. oryzae* törzsszel fertőzött csoport - immunszupresszált;

***R. microsporus* / i.s.:** *R. microsporus* törzsszel fertőzött csoport - immunszupresszált;

***R. oryzae* / nem i.s.:** Kontroll csoport *R. oryzae* uracil auxotróf törzsszel fertőzve - nem immunszupresszált;

PBS / nem i.s.: abszolút kontroll csoport, nem immunszupresszált, spórával nem lett fertőzve.

Napok száma: is: immunszupresszált; -3,-2,-1: immunszupresszió kialakításának időszaka; 0: fertőzés napja; +1 – +7,5: az állatok elhullásának időszaka.

6.5.2.1. Immunszupresszált csoport *R. oryzae* uracil auxotróf törzsszel fertőzve

A vártak megfelelően, az immunszupresszált egércsoportok közül, az *R. oryzae* törzsszel fertőzött csoportnál kezdődött el korábban a pusztulás és a legütemesebb egyed elhullást lehetett megfigyelni. Az elhullás már az infekciótól számított másfél nap elteltével elkezdődött. Az infekciótól számított 2. napon újabb 2 egyed pusztult el (9. táblázat), ekkorra már a csoport többi tagjánál is szemmel látható külső jelei voltak a zigomikózis kialakulásának. Szőrük borzas volt, valamint az egyedek nagy részénél az

egyik vagy mindkét szem gyulladás jeleit mutatta, váladékozott. Ezen felül, a legtöbb egyednél az orr körüli rész duzzadt, gyulladt volt. A fertőzéstől számított 3. napon az életben maradt egyedek többsége, gubbasztó magatartást mutatott, kevésbé voltak mozgékonyak, súlyuk folyamatosan csökkent. Három és fél nap valamint 4 nap elteltével ismét 2 - 2 egyed pusztult el (9. táblázat). Elhulláskor az egyedek átlagosan 20 - 21 g-osak voltak. Egyetlen egyed élte túl a fertőzést. Ebben az esetben vélhetően nem sikerült immunszuppresszív állapotot kialakítani, testsúlya a többi egyedhez képest nem csökkent az immunszuppresszív anyag adagolását követően sem, míg a kísérletben résztvevő többi egyednél a kezdeti súlyhoz viszonyítva átlagosan 2 g fogyás volt megfigyelhető három napos ciklofoszfamid kezelés után.

6.5.2.2. Immunszuppresszált csoport, *R. microsporus* törzsszel fertőzve

A *R. microsporus* törzsszel fertőzött egércsoportnál az infekciót követő 3. napon kezdődött az elhullás (9. táblázat). Majd a fertőzést követő 4,5 nap elteltével 1 újabb egyed elhullása következett be, 5. napon 2 egyed és 7,5 nap elteltével még 1 egyed pusztult el (9. táblázat). A *R. microsporus* törzsszel fertőzött egyedek körében az elhullás üteme hosszabb lecsengésű volt, mint *R. oryzae* esetében. Az infekciótól számított 5. napon vált szemmel láthatóvá 2 egyednél a mikózis jele, szőrük borzas lett, kevésbé voltak mozgékonyak a többi egyedhez képest, valamint a has erőteljes felfúvódása volt megfigyelhető. A fertőzéstől számított 7,5 nap után további elhullást nem következett be. 5 egyed élte túl a fertőzést immunszuppresszált állapotban *R. microsporus* törzsszel történő fertőzést követően.

6.5.2.3. Nem-immunszuppresszált kontroll csoport, *R. oryzae* uracil auxotróf törzsszel fertőzve

Ennél a csoportnál nem történt immunszuppresszió. A kísérletet megelőző -3., -2., -1. napon a csoport egyedei PBS pufferrel lettek oltva intraperitoneálisan. Az infekció után az egyedek élénksége megmaradt, súlyuk a napok előrehaladtával folyamatosan nőtt, betegség jelei nem mutatkoztak rajtuk. Az infekció után egyetlen egyed sem pusztult el.

6.5.2.4. Nem-immunszuppresszált abszolút kontroll csoport

Az abszolút kontroll csoport egyedei PBS pufferrel lettek oltva ip. a kísérlet -3., -2., -1. napon. Az infekció napján az egyedekkel 20 µl PBS puffer lett inhaláltatva. A kísérlet során a kontroll és az abszolút kontroll csoport egyedeinek a súlya hasonló gyarapodási mértéket mutatott. Ebben a csoportban egyetlen egyed sem pusztult el.

6.5.3. A mikózis lefolyásának összefoglalása

A *R. oryzae* uracil auxotróf törzzsel történő fertőzést követő 1,5 nap elteltével kezdődött el az immunszupresszált egyedek elhullása és az infekciót követő 4. npra 10%-os túlélési aránnyal zárult. Valószínű, hogy az életben maradt egyednél az immunszupresszió nem volt sikeres, ugyanis az egyed testsúlyából nem veszített a kísérlet során, valamint a fertőzést követő gubbasztó magatartás is elmaradt. A csoport többi egyedéhez képest szemmel is jól láthatóan egészséges volt, élénken mozgott, és a kontroll nem-immunszupresszált egerekhez hasonló mértékű táplálék mennyiséget fogyasztott el, míg a többi immunszupresszált egyed táplálkozási kedve visszaesett. *R. microsporus* törzzsel történő fertőzés után 50%-os volt a túlélési arány. Az *R. oryzae* törzzsel fertőzött egyedek elhullása már lezárult, amikor a *R. microsporus* törzzsel fertőzött egyedek erőteljes pusztulása megkezdődött. A két törzs esetén a zigomikózisos egyedek elhullását a 10. táblázat foglalja össze:

Gomba törzs / egér csoport	Pusztulás kezdete (nap)	Pusztulás vége (nap)	Túlélők
<i>R. oryzae</i> / i.s.	+ 1,5	+ 3,5	10%
<i>R. microsporus</i> / i.s.	+ 3	+ 7,5	50%
<i>R. oryzae</i> / nem i.s.	0	0	100%
PBS / nem i.s.	0	0	100%

10. táblázat: Túlélés egyes fertőzési csoportokra nézve.

R. oryzae törzs esetén 1,5 naptól 3,5 napig, *R. microsporus* törzs esetén a 3. naptól 7,5 napig tartott az elhullás. A kontroll és abszolút kontroll csoportok esetében nem történt halálozás.

A fertőzést túlélő egyedek súlya - minden kísérleti csoportot számba véve - az infekciót követő 10. naptól kezdve növekedni kezdett. Valószínűleg az immunszupresszió hatása ekkorra már erőteljesen lecsökkent.

6.5.4. A kísérleti állatok szerv-szuszpenzióinak vizsgálata YEG táptalajon

Az infekció, majd az invázió kialakulása után elpusztult egereket felboncoltuk, a pusztulást követő 10 percen belül. Az állatok életének kioltása CO₂ kamrában történt, amikor már az egyed mozgásra képtelen volt és akadozott a légzésük. A szerveket lemértük, súlyukat feljegyeztük és PBS pufferben tároltuk 4 °C-on a boncolás végeztéig. Majd a szervekből szerv-szuszpenziót készítettünk üveg-homogenizátorral. A tömény mintából és annak 10x-es hígításából valamint a vena cava inferior-ból gyűjtött vérmintát

penicillin-streptomocinnel (10,000 unit penicillin és 10 mg/ml streptomycin 0,9% NaCl oldatban) kiegészített YEG táptalajra szélesztettük. 12 órán át 37 °C-on inkubáltuk a csészéket. Majd fotót és feljegyzést készítettünk, azokról a csészékről, amelyekben a kioltott szerv-szuszpenzióból gomba telep indult növekedésnek.

Az elpusztult egyedeknél a következő szervekből készítettünk szuszpenziót: agy, szív, gyomor, vastagbél, máj, lép, hasnyálmirigy, tüdő, vesék. Valamint a lehetséges fertőzött területekről szövetmintát vettünk és táptalajra helyeztük: orrcsont, orrüreg, szemzug, szemgolyó, pofabőre, fejbőr, vér.

A táptalajon növekedésnek indult telepek számából nem lehet számbeli következtetést levonni, csupán hozzávetőleges információt ad az adott szerv fertőzöttségi fokáról. Ugyanis a szervek homogenizálása során a szervben található gombafonalak is felaprózódnak, így egy spórából képződött gombafonalból a táptalajon több telep is növekedésnek indulhat. Viszont egyértelmű információt kapunk, arról hogy az adott szerv gombával fertőzött vagy sem. Az egyes kísérleti csoportoknál az adott gombatörzsre vonatkozó szervek fertőzöttségéről a 11-12. táblázat ad információt.

A mikózisban elpusztult egyedeknél átlagosan 2-3 szerv volt érintett a fertőzésben. Az összes felboncolt egyed szerveinek fertőzöttsége a következőképpen alakult: leggyakoribb mikózisforma volt a nazális mikózis, 12 esetben figyeltük meg, ebből csak a szinuszokra kiterjedő fertőzés 2 esetben fordult elő. 17 egyedet boncoltunk fel, ebből 10 esetben mutattuk ki cerebrális mikózist, melyből 9 esetben lehetett megállapítani rhinocerebrális zigomikózist. A 9 rhinocerebrális zigomikózis eloszlása a következő volt: 7 eset az *R. oryzae* törzssel történő fertőzéskor alakult ki, *R. microsporus* törzs esetén 2 egyednél lehetett beazonosítani (11.-12. táblázatban lila színnel jelölve). Orbitális infekciót 2 alkalommal, pulmonális fertőzést 1 esetben és gasztrointesztinális mikózist 6 esetben figyeltünk meg. A gasztrointesztinális mikózisok esetében a gyomor fertőzését 3, a lép fertőzöttségét 1, a vastagbél mikózisát 2 esetben írtunk le. A 13. táblázat az egyes kísérleti csoportokban az összes felboncolt állat szerveinek számát az adott kísérleti csoport fertőzött szerveinek számával, valamint összegzésképpen az egyes szervekre vonatkozó összes fertőzés számot a felboncolt egyedek számával hasonlítja össze. A 14. táblázat az egyes kísérleti csoportokban az összes felboncolt állat számát és egyes szerveinek fertőzöttségét, valamint az összes felboncolt egyed szerveinek fertőzöttségét mutatja be százalékosan kifejezve.

<i>R. oryzae</i> / i.s.																
egyed/szerv	agy	szív	gyomor	vastagbél	máj	lép	hasnyálmirigy	tüdő	orrcsont	orrüreg	szemzug	szem	pofabőr	fejbőr	vese	vér
f	x	-	x	-	-	-		x	x	x	-	-	-	-	-	-
h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x b	-	-	x b	-	-
r	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x j	-	-	-	-	-
j1	nem lett boncolva															
j2	nem pusztult el															
b1	x	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-
b2	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
hf	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
hj2	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x j	-	-	-	-	-
hb2	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x b	-	-	-	-	-

11. táblázat: Immunszupresszált csoport *R. oryzae* uracil auxotróf törzsszel fertőzve.

R. oryzae / i.s.: *R. oryzae* törzsszel fertőzött csoport – immunszupresszált. **Egerek jelölése:** **f:** fej; **h:** hát; **r:** farok; **j1:** jobb mellső láb; **j2:** jobb hátsó láb; **b1:** bal mellső láb; **b2:** bal hátsó láb; **hf:** hát-far; **hj2:** hát-jobb hátsó láb; **hb2:** hát-bal hátsó láb. **b:** baloldali; **j:** jobb oldali, **x:** szervből izolálható volt *R. oryzae*.

<i>R. microsp.</i> / i.s.																
egyed/szerv	agy	szív	gyomor	vastagbél	máj	lép	hasnyálmirigy	tüdő	orrcsont	orrüreg	szemzug	szem	pofabőr	fejbőr	vese	vér
f	nem pusztult el															
h	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x b	-	x b	-	-
r	nem pusztult el															
j1	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
j2	nem pusztult el															
b1	x	-	x	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
b2	nem pusztult el															
hf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
hj2	x	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-
hb2	nem pusztult el															

12. táblázat: Immunszupresszált csoport, *R. microsporus* törzsszel fertőzve.

R. microsporus / i.s.: *R. microsporus* törzsszel fertőzött csoport – immunszupresszált. **Egerek jelölése:** **f:** fej; **h:** hát; **r:** farok; **j1:** jobb mellső láb; **j2:** jobb hátsó láb; **b1:** bal mellső láb; **b2:** bal hátsó láb; **hf:** hát-far; **hj2:** hát-jobb hátsó láb; **hb2:** hát-bal hátsó láb. **b:** baloldali; **j:** jobb oldali, **x:** szervből izolálható volt *R. microsporus*.

Összminta/ Fertőzött minta																
egér csoport/szerv	agy	szív	gyomor	vastagbél	máj	lép	hasnyálmirigy	tüdő	orrcsont	orrüreg	szemzug	szem	pofa bőr	fejbőr	vese	vér
<i>R. oryzae</i> / i.s.	8/7	8/0	8/1	8/0	8/0	8/0	8/0	8/0	8/2	8/7	8/4	8/0	8/0	8/1	8/0	8/0
<i>R. microsporus</i> /i.s	5/3	5/1	5/2	5/2	5/0	5/1	5/0	5/1	5/0	5/3	5/0	5/1	5/0	5/1	5/0	5/0
<i>R. oryzae</i> / nem i.s.	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0
Abszolút kontroll	1/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0
Össz minta/ Fertőzött minta	17/10	17/1	17/3	17/2	17/0	17/1	17/0	17/1	17/2	17/10	17/4	17/1	17/0	17/2	17/0	17/0

13. táblázat: Az egyes egér csoportokban felboncolt egyedek száma/az adott fertőzött szervek száma.

R. oryzae / i.s.: *R. oryzae* törzzsel fertőzött csoport - immunszuppresszált;

R. microsporus / i.s.: *R. microsporus* törzzsel fertőzött csoport - immunszuppresszált;

R. oryzae / nem i.s: Kontroll csoport *R. oryzae* uracil auxotróf törzzsel fertőzve - nem immunszuppresszált;

PBS / nem i.s.: abszolút kontroll csoport, nem immunszuppresszált, spórával nem lett fertőzve.

Szervenkénti fertőzöttség egyes törzsekre nézve %-ban kifejezve																
egér csoport/szerv	agy	szív	gyomor	vastagbél	máj	lép	hasnyálmirigy	tüdő	orrcsont	orrüreg	szemzug	szem	pofa bőr	fejbőr	vese	vér
<i>R. oryzae</i> / i.s.	87,5%	0%	12,5%	0%	0%	0%	0%	0%	25%	87,5%	50%	0%	0%	12,5%	0%	0%
<i>R. microsporus</i> /i.s	60%	20%	40%	40%	0%	20%	0%	20%	0%	60%	0%	20%	0%	20%	0%	0%
<i>R. oryzae</i> / nem i.s.	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Abszolút kontroll	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Össz fertőzött minta %-ban	58%	5,8%	17,6%	11,7%	0%	6%	0%	5,8%	11,7%	58,8%	23,5%	5,8%	0%	11,7%	0%	0%

14. táblázat: Az egyes egér csoportokban felboncolt egyedek szerveinek fertőzöttsége %-ban kifejezve.

R. oryzae / i.s.: *R. oryzae* törzzsel fertőzött csoport - immunszuppresszált;

R. microsporus / i.s.: *R. microsporus* törzzsel fertőzött csoport - immunszuppresszált;

R. oryzae / nem i.s: Kontroll csoport *R. oryzae* uracil auxotróf törzzsel fertőzve - nem immunszuppresszált;

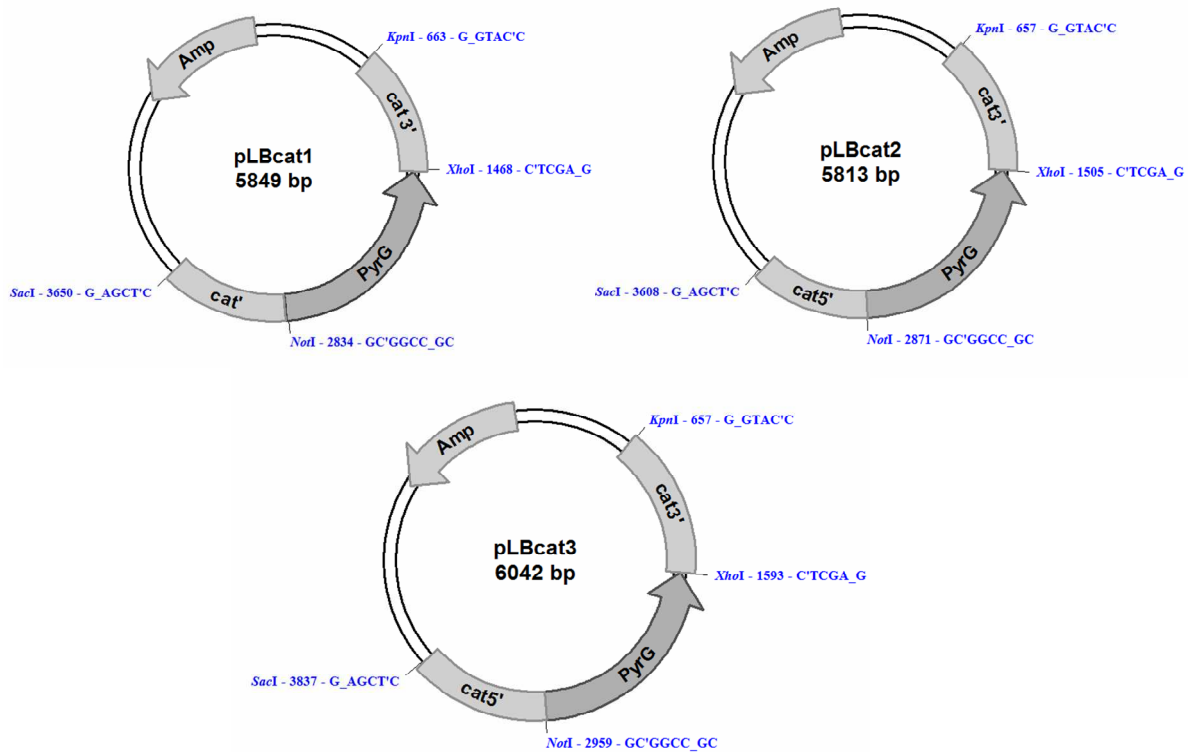
PBS / nem i.s.: abszolút kontroll csoport, nem immunszuppresszált, spórával nem lett fertőzve.

6.6. A katalázt kódoló gének deléciójához szükséges transzformáló vektorok megszerkesztése

A katalázok patogenitásban betöltött szerepének tisztázásához *cat1*⁻, *cat2*⁻, *cat3*⁻, *cat4*⁻ deléciós mutáns törzsek létrehozását terveztük. A kataláz gének deléciójához a *Rhizopus* adatbázis alapján azonosított *cat1*, *cat2*, *cat3*, *cat4* gének határoló régióira alapozott transzformáló vektorokat készítettünk, amelyek a *R. oryzae cat1*, *cat2*, *cat3*, *cat4* génbe inszertálva tartalmazzák az orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxilázt kódoló *pyrG* gént, mint szelekciós markert.

A patogén gombák genetikai hátterének vizsgálata hatékonyan működő transzformációs rendszereket igényel. A transzformációs módszerek sikeres alkalmazásának alapja a transzformánsok szelekcióját biztosító rendszerek megléte. Járomspórás gombáknál a transzformációs rendszerek főként auxotróf markerek komplementációjára épülnek. Esetünkben rendelkezésre állt egy uracil auxotóf, *pyrG*⁻ mutáns törzs, mely egy zigomikózisból izolált *R. oryzae* törzs származéka. A *Rhizopus* genom adatbázisból nyert DNS szekvencia alapján a *cat1*, *cat2*, *cat3*, géneket határoló szakaszok felszaporítására specifikus indító szekvenciákat terveztünk.

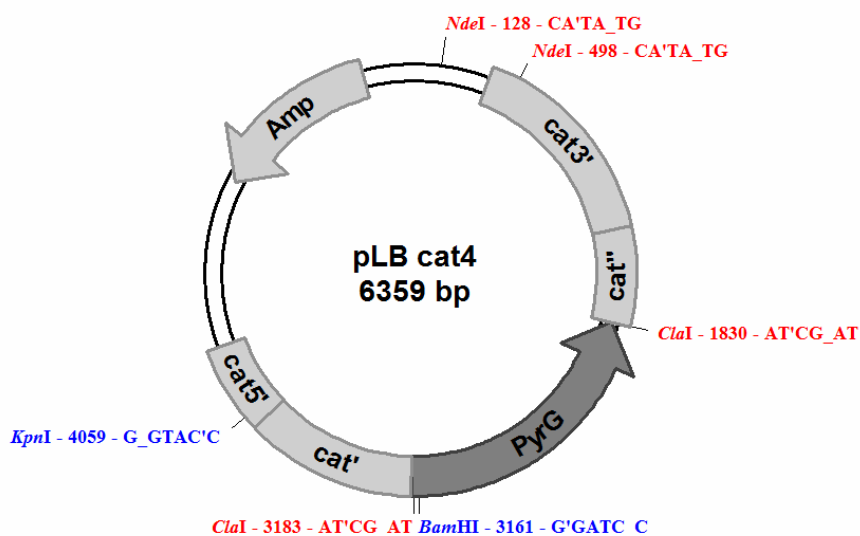
A géneket megelőző szakasz felamplifikálását szolgáló forward primerek minden esetben *SacI*, míg a reverz primerek *NotI* hasítóhelyet hordoztak. A géneket követő szakaszoknál alkalmazott forward primerek mindegyike *XhoI*, reverz primerek *KpnI* hasítóhelyet hordozott. A *cat1* gén esetében a gént megelőző szakaszban lévő szekvencia magas adenin és timin bázis tartalma miatt primer tervezési nehézségekbe ütköztünk. Ezért ennél a génnél a gént megelőző szakasz helyett a kataláz gén elejéből szaporítottunk fel és izoláltunk egy 805 bp-os szakaszt. A többi gén esetén a gént megelőző és gént követő szakaszok kerültek felszaporításra. A PCR-rel reakciót követően a gének előtti szakaszokat *SacI-NotI* restrikciós enzimekkel emésztettük, pBluescript SK+ vektor azonos hasítóhelyei közé építettünk. A következő lépés a szelekciót biztosító gén bevitele volt. A rendelkezésünkre álló pEPM901 plazmidból a *pyrG* gént *NotI-XhoI* restrikciós endonukleázokkal kivágtuk és beépítettük a pBluescript SK+ vektor *NotI* és *XhoI* hasítóhelyei közé. A PCR-rel reakciót követően a gének utáni szakaszokat *XhoI-KpnI* restrikciós enzimekkel emésztettük, a pBluescript SK+ vektorokba a *pyrG* gént utáni *XhoI-KpnI* hasítóhelyekre klónoztuk. Ezáltal előállítottuk a kataláz gének delécióját lehetővé tevő vektorokat: pLB *cat1*, pLB *cat2* és pLB *cat3* (27. ábra).



27. ábra: A kataláz gén delécióját lehetővé tevő pLBcat1, pLBcat2 és pLBcat3 plazmidok sematikus rajza.

A *cat4* gén elejét és végét izoláltuk a határoló régiókkal. Az 1201 bp-os felszaporított termék (*cat5'**cat'*), a *cat4* gént megelőző 392 bp-os szakaszt (amely a promotert is hordozza), valamint a *cat4* gén elejéből 809 bp-t tartalmaz. Az 1495 bp-os PCR termék (*cat''cat3'*) a *cat4* gén végének 494 bp-os szakaszát és a gént követő 1001 bp-t foglalja magába. Mindkét fragmentum pBluescript SK+ vektorba lett klónozva. A *cat4* gént megelőző és követő régiójára tervezett primer párok, hasító helyeket nem tartalmaztak, ennek következtében a traszformáló vektor összeépítése néhány plusz lépést igényelt. A pBluescript SK+_*cat''cat3'* plazmidból a kataláz gén végét és a gént követő régiót kódoló szakaszt *SmaI-HincII* enzimekkel kivágtuk és *HincII* enzimmel linearizált pUC18 plazmidba klónoztuk. Ezt követően a pUC18_*cat''cat3'* vektort *ClaI-BamHI* enzimekkel linearizáltuk, pEPM901 vektorból a *Mucor pyrG* gént *ClaI-BamHI* enzimmel kiemésztettük és a linearizált vektorba klónoztuk. A pBluescript SK+_*cat5'**cat'* plazmidból a kataláz gén promotérét és a gén elejét kódoló szakaszt *PstI-SaII* enzimekkel vágtuk ki és a pUC18 plazmid megfelelő helyére klónoztuk. Ezzel a lépéssel plusz hasító helyekhez jutottunk, amelyek elősegítették a végleges vektor konstrukció összeépítését. A

pUC18_cat5'cat' vektorból a cat5'cat'génszakaszt *EcoRI*-*Bam*HI-el kivágtuk és a pUC18_cat''cat3'_ *pyrG* vektor megfelelő helyére klónoztuk. Az így kapott plazmid a pLBcat4 (28. ábra).). A klónozott DNS szakaszok szekvenciájának meghatározása mind a négy transzformáló vektor esetén pBluescript SK+ vektoron található T3 és T7 primerek segítségével történt.



28. ábra: A *cat4* gén deléciójához készített pLBcat4 plazmid térképe.

A vektorok tehát hordozzák a *Mucor pyrG* gént (mint szelekciós markert) körülvéve a kataláz gének 5' és 3' irányból határoló régióival (ezek irányítják a kettős homológ rekombinációt, amelynek eredményeként az egész kazetta a kiütni kívánt gén helyére integrálódhat), valamint a bakteriális transzformáció során alkalmazott ampicillin rezisztencia gént is.

6.6.1. Transzformációs kísérletek

A transzformációs kísérletek alapja VAN HEESWIJCK és RONCERO (1984) által leírt PEG-mediált transzformáció protokoll volt.

A pLBcat4 vektorból *NdeI* és *KpnI*, míg pLBcat1, pLBcat2, pLBcat3 vektorok esetében *SacI* és *KpnI* restrikciós enzimek segítségével vágtuk ki a teljes deléciós kazettát. A tisztított lineáris fragmentumokkal PEG-mediált protoplaszt-transzformációs kísérleteket

végeztünk *R. oryzae* uracil auxotróf törzzsel. A pLBcat plazmidokból nyert lineáris deléciós kazettákkal történő transzformációval párhuzamosan, kontrollként, pEPM901 cirkuláris plazmiddal (mely csak a *pyrG* gént hordozza, a sejten belül autonóm replikálódó módon fennmaradva komplementálja az uracil auxotrófiát) is transzformáltuk a recipiens törzset. Járomspórás gombák esetén a transzformáló plazmidok általában autonóm replikálódó módon maradnak fenn (IBRAHIM és SKORY 2006), azonban teljesen alkalmatlanok olyan vizsgálatokban, amikor a genomi DNS célzott elrontása, illetve a génkiütés következményeinek vizsgálata a cél. (Ezzel a transzformációval a későbbi kísérletekben azt kívánjuk igazolni, hogy a létrejövő kataláz deléciós törzsek hidrogén-peroxid toleranciájának a változása, valóban a kataláz gének elrontásának a eredménye és nem pusztán az auxotrófia komplementálása, vagy más transzformáció általi behatás következménye).

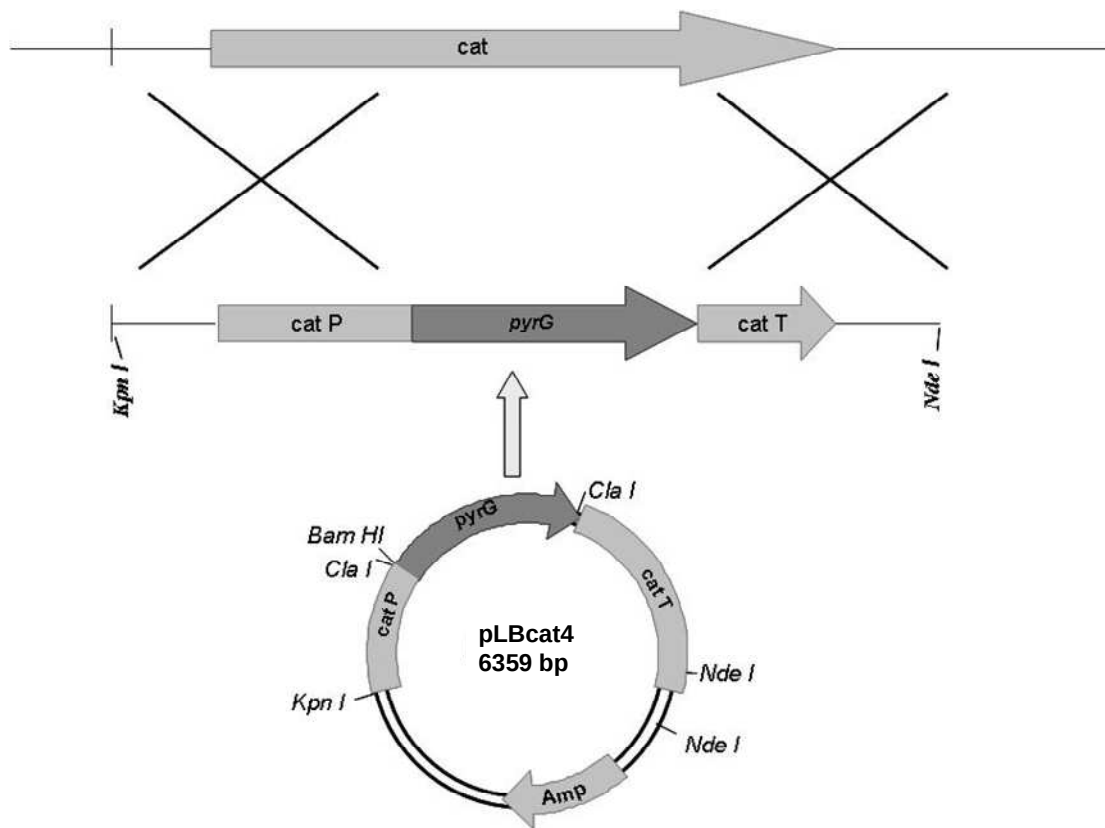
Plazmid név	Linearizációhoz használt restrikciós enzimek	Lineárizált fragmentum mérete (bp)	Kettős rekombinációban résztvevő homológ szakaszok hossza (bp)		Protoplasztok száma
			up	dw	
pLBcat1	<i>SacI</i> - <i>KpnI</i>	2987	816	805	10 ⁵
pLBcat2	<i>SacI</i> - <i>KpnI</i>	2951	737	848	10 ⁵
pLBcat3	<i>SacI</i> - <i>KpnI</i>	3180	878	936	10 ⁵
pLBcat4	<i>NdeI</i> - <i>KpnI</i>	3556	891	1332	10 ⁵

15. táblázat: Transzformáció során alkalmazott lineáris fragmentumok jellemzői.

up: gént megelőző szakasz, **dw:** gént követő szakasz.

MICHIELSE és mtsi. (2004) kísérletek alapján arra a megállapításra jutottak, hogy járomspórás gombák stabil, integratív transzformációja csak endogén vagy rokon DNS bevitelével érhető el. Az általunk megszerkesztett lineáris fragmentumok a tönkretenni kívánt géneket szegélyező, nagy kiterjedésű homológ szakaszokat hordoznak, amelyek lehetővé teszik a *R. oryzae* genomjában megtalálható kataláz géneket határoló régiók közötti kettős rekombináció lejátszódását (SKORY 2002), ami a kataláz gének *pyrG* génre történő kicserélődését eredményezi (29. ábra). **A négy különböző kataláz deléciós törzs létrehozása, illetve a transzformánsok elemzése jelenleg még folyamatban van. A**

transzformáció során alkalmazott lineáris fragmentumok jellemzőit 15. táblázat foglalja össze.



29. ábra: A kataláz géneket határoló régiók közötti kettős rekombináció lejátszódása, ami a kataláz gének *pyrG* génre történő kicserélődését eredményezi.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A járomspórás gombák opportunistá patogénként immunszupreszált betegekben heves lefolyású és gyakran halálos kimenetelű fertőzéseket okozhatnak. *Candida* és *Aspergillus* fajok átlal okozott megbetegedések mellett, figyelmet érdemel a zigomikózis kialakulásának száma, amely az elmúlt években folyamatosan és erőteljesen emelkedik. A szervezet immunrendszerének csökkent működése a zigomikózisok döntő többségében bizonyított. Az invazív gombafertőzésekkel szembeni védekező mechanizmusok közt fontos szerepe van az oxidatív öllő sejteknek. A fagociták által termelt oxidatív termékek egy irányított folyamatban elárasztják és elpusztítják a mikroorganizmusokat. A katalázoknak az opportunistá gombafertőzések kialakulásában betöltött szerepét *Aspergillus fumigatus* és *Candida albicans* esetében vizsgálták részletesebben. Ezek a vizsgálatok alátámasztották a fagociták által termelt oxidánsok fontosságát a gazda mikrobával szembeni védekezőképessége szempontjából. A neutrofil sejtek által termelt hidrogén-peroxid hatékonyan pusztítja el a gomba hifákat. Mindezek alapján a mikrobiális kataláztermelést lehetséges virulenciafaktornak gondolják, különösen olyan betegeknél, akiknél a neutrofil sejtek funkciója károsodott.

- Munkánk során célul tűztük ki *in vitro* körülmények között szilárd és folyadék tápoldatban a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz *R. oryzae* és *R. microsporus* növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálatát, különböző tenyésztési feltételek mellett a gomba eltérő életállapotaiban. Megállapítottuk, hogy 1,5 mM koncentrációjú hidrogén-peroxid által kifejtett oxidatív stressz hatása mindkét törzs esetén 50% körüli növekedés gátlást eredményez. Ennél kisebb koncentrációjú hidrogén-peroxid hatására csak kis mértékben gátlódott a gomba törzsek növekedése. Ennél nagyobb koncentrációban alkalmazott hidrogén-peroxid hatására a *R. oryzae* törzshöz képest mind minimál (YNB), mind komplett tápoldatban (YEG) a *R. microsporus* törzs bizonyult érzékenyebbnek. A *R. oryzae* törzs esetén, YNB tápoldatban 2,5 mM felett, YEG tápoldatban 5 mM felett teljes növekedés gátlás volt megfigyelhető. További kísérleteinkben az oxidatív stressz kiváltására 1,5 mM hidrogén-peroxido koncentrációt használtunk.
- A kataláz gének funkcionális jellemzésének kezdetén nem rendelkezünk információval a spórák csírázásának dinamikájáról. Meghatároztuk a spórák csírázásának idejét *R. oryzae* uracil auxotróf törzs esetén, hidrogén-peroxid jelenlétében és hiányában. Optimális körülmények között történő tenyésztés esetén a sporangiospóra a leoltástól

számított 4. órában, míg oxidatív stressz hatás alatt a 6. órában kezdett csírázni. Ez a kísérlet fontos támpontot adott a további vizsgálataink során történő mintavételi időpontok meghatározásában.

- Catalase Assay Kit segítségével, eltérő fejlődési szakaszokban megmértük a *R. oryzae* és a *R. microsporus* össz-kataláz aktivitásának változását.
- A *R. oryzae* genomadtbázisban négy kataláz homológ szakaszt találtunk. A fehérjék aminosav szekvenciáját más mikrobákból származó katalázok aminosav sorrendjével összehasonlítottuk. Az aminosav szekvenciák filogenetikai elemzésével törzsfát készítettünk. A *R. oryzae* genomadtbázisában található kataláz fehérjék szekvenciái a filogenetikai törzsfá analízis alapján a KLOTZ és munkatársai által 2003-ban készített kataláz törzsfá hem tartalmú monofunkcionális katalázainak 2-es és 3-as kládjába sorolhatóak be. A *cat1* gén a 3-as kládban foglal helyet, a peroxisómális katalázokkal mutat nagy hasonlóságot. A *cat2*, *cat3*, *cat4* gének a monofunkcionális katalázok 2-es kládjába illeszkednek be, mindhárom fehérje a törzsfán egymáshoz közel helyezkedik el.
- A *R. oryzae* katalázok háromdimenziós molekulamodellezése a más élőlényekből meghatározott kataláz fehérjék háromdimenziós molekulamodelljének homológia-modellezése által valósult meg. Az NCBI adatbázisában lévő háromdimenziós molekulamodellezett katalázok és a *R. oryzae* katalázok aminosav sorrendjének illesztése után kapott rangsort alapul véve először a monomerek molekulaszervezetének illesztését végeztük el. Közismert, hogy a katalázok polimer, főképpen homotetramer formában aktívak, monomerenként aktív centrumukban egy-egy hem-et tartalmazva. A monomerek illesztését heteroatomok (hem) nélkül, majd heteroatomokkal végeztük, az így kapott szerkezetet loop modellezéssel finomítottuk. A létrehozott monomereket négy láncból álló homotetramerek fölépítésére használtuk fel, amelyek vizsgálatával megállapítható volt, hogy a modellezett katalázok aktív centruma nagymértékben konzervált. Az így kapott modellek aktív centrumában egyformán jelen volt az a hisztidin, amelynek mutációjával a fehérjék funkcióképtelenné válnak.
- Ezek az eredmények lehetővé teszik, a teljes kataláz gének izolálása után, olyan mutáns kataláz gének létrehozását, amelyek a modellezés által meghatározott aminosav cseréjével a leírt kísérleti körülmények között csökkent védekező képességű gombatörzset eredményeznek. Ennek teljes kísérleti megerősítése sejtes rendszerben nagy mennyiségű fehérje termeltetése, és kristályosítás után röntgendiffrakciós szerkezet meghatározással lehetséges.

- Kvantitatív PCR segítségével megállapítottuk egy - egy gén aktivitásának változását a fejlődés előrehaladtával, oxidatív stressz jelenlétében és hiányában. YEG tápoldatban optimális körülmények között történő tenyésztés során a *cat1* gén aktivitás, oxidatív stressz hatására a *cat2* és *cat4* gének aktivitása volt jelentős. A spórát ért oxidatív stressz esetén a *cat4* gén mutatott erőteljes aktivitást.
- Izoenzim analízis által képet kaptunk arról, hogy a gomba eltérő életállapotaiban változás áll be a különböző katalázok kifejeződésének intenzitásában. Vizsgálatainkban világossá vált, hogy hidrogén-peroxid által keltett oxidatív stressz hatására erőteljes enzimaktivitás növekedés következik be.
- Állatkísérletek során *R. oryzae* és *R. microsporus* fertőzőképességét vizsgáltuk, egészséges és immunszuppresszált egyedekben egyaránt. Olyan egérmoddellről nem találtunk irodalmi adatot, ahol a *R. oryzae* mikózis ciklofoszfamiddal indukált immunszuppresszió esetében következett be. Kísérleteinkből kiderült, hogy a *R. oryzae* immunszuppresszált egyedekben erőteljesebb fertőzést képes kiváltani, a mikózis fő megjelenési formája a rhinocerebrális zigomikózis, amely gyors lefolyású, és a fertőzött egyedek 90%-os elhullását okozza a fertőzést követő 3 napon belül. *R. microsporus* esetén a fertőzés lassabb lefolyású, főképpen a gasztrointesztinális területeket érinti. A fertőzést követő túlélés 50%-os a fertőzést követő 7,5 nap elteltével.
- A *R. oryzae* genomadatbázisban található négy kataláz homológ szakasz elejére és végére specifikus primereket terveztünk, PCR-el felszaporítottuk, izoláltuk és plazmidba klónoztuk. A kataláz enzimek patogenitásban betöltött szerepének vizsgálatához mind a négy gén esetén gének elrontását lehetővé tevő transzformáló vektorokat készítettünk, melyek a kataláz génekbe inszertálva tartalmazzák a szelekciót biztosító *pyrG* marker gént. A patogenitás hátterének és a katalázok virulenciában betöltött szerepének vizsgálatához szelekciós és transzformációs rendszerre van szükség. Rendelkezésünkre állt a *R. oryzae* zigomikózisból izolált, uracil auxotróf *pyrG*⁻ mutáns törzse, így nem kellett külön a transzformációhoz szükséges mutánst előállítani. Az általunk készített deléciós vektorokkal jelenleg transzformációs kísérletek folynak.

8. SUMMARY

Certain zygomycetes are opportunistic pathogens, which can cause severe and frequently fatal infections in immunosuppressed patients. The importance of this fungal group is underlined by the fact that the number of such infections has been rising continually and dynamically in the last few decades. Natural killer cells play an important role in the defensive mechanisms against invasive mycosis. Oxidative products generated by phagocytic cells kill the microorganisms in a controlled process. The role of catalases in the development of opportunistic mycosis has been studied in detail in the cases of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. These tests confirmed that catalases provide protection against reactive oxygen radicals produced by neutrophil granulocytes of the human immune system. Hydrogen peroxide produced by the neutrophil granulocytes destroys fungal hyphae efficiently. Based on these findings, microbial catalase production can be considered a possible virulence factor.

- The aim of our study was to investigate the effect of H₂O₂ induced oxidative stress on the growth of *R. oryzae* *in vitro*. This effect was examined in solid and liquid medium and at different developmental stages of the fungus. It was found that the oxidative stress generated by 1.5 mM H₂O₂ caused about 50% growth inhibition. Lower concentrations of H₂O₂ caused only a slight growth inhibition, while higher concentrations of H₂O₂ (>2.5 mM) led to total blockade of the fungal growth in minimal (YNB) and complete (YEG) media. According to these findings, 1.5 mM H₂O₂ was used to generate oxidative stress in the further experiments.
- At the beginning of the functional characterization of the catalase genes, we did not have information on the dynamics of spore germination. We determined the time of the spore germination of the *R. oryzae* uracil auxotrophic strain in the presence and absence of H₂O₂. Under optimal growth conditions, the germination of sporangiospores started at 4 hours after inoculation, while this time shifted to 6 hours under oxidative stress. This experiment served important information for further studies about the time intervals of sampling.
- The total enzyme activity of the catalases determined by a Catalase Assay Kit showed variations in the different developmental stages of the fungus and under oxidative stress conditions.

- Phylogenetic analysis of the *R. oryzae* catalase genes. We found four catalase homologous regions in the genome database of the *R. oryzae*. Several catalase genes have been identified in other filamentous fungi and yeasts. The amino acid sequences of the corresponding proteins were compared to those of the four *R. oryzae* catalases. Based on these amino acid sequences, a phylogenetic tree was inferred. Topology of this phylogenetic tree corresponded well to that presented previously by Klotz et al (2003). Catalases of *R. oryzae* situated in the clades 2 and 3 of the heme-containing monofunctional catalases on this tree. CAT1 seems to be a member of clade 3 and shows great similarity to the peroxisomal catalases, while CAT2, CAT3 and CAT4 belong to clade 2.
- The 3D structure of catalases of *R. oryzae* was built by homology modelling based on experimental structures of other catalases. Templates for the homology modelling were obtained by sequence alignment of the *R. oryzae* sequences against the pdb database of NCBI by PSI-BLAST search. Proteins above a reliable alignment score were selected.. Although it is well known that catalases function in homotetrameric form, a preliminary ranking of the templates was performed by homology modelling for later tetramer modelling using the protein monomeric chains. Each monomer contains a *hem* b fused ring in its active centrum, thus the homology modelling was performed with not only the protein chains but also using the *hem* molecules in place. The presence of *hem* caused a great improvement in the quality of the models. Further refinement of the models was observed by applying a second loop modelling step. The templates were ranked by the percent structural overlap values between the monomer models and the corresponding templates and the best scored templates were used in the final multichain-multitemplate homology modelling. In these models, the active centres were found to be highly conserved containing the key amino acid histidine. The mutation of this residue was found to demolish the activity of the catalase in *P. mirabilis*.
- After isolation of the catalase genes, these results make possible to determine the site of the point mutations, which may result in fungal strains with decreased defence ability in the described experimental conditions. The final verification of these hypotheses could be performed by X-ray diffraction of crystals of the proteins obtained from expression the genes in proper cells.
- Quantitative PCR was used to determine the change in the gene expression during the growth of the fungus and in the presence of oxidative stress. The strongest activity was

measured for the *cat1* gene in each developmental stage under normal growth conditions, followed by the gene expression activity of *cat2*. Under oxidative stress conditions, the *cat2* gene showed the highest expression level. The *cat4* gene was activated by oxidative stress in the spore and by internal stress under normal conditions in later periods of cultivation.

- Isoenzyme analysis revealed changes in the intensity of the expression of the different catalases during the fungal growth.
- Studies using both healthy and immunosuppressed animal models were used to study the virulence of *R. oryzae* and *R. microsporus*. Animal models of *R. oryzae* mycosis developed in mice, in which immunosuppression was induced by cyclophosphamid, has not been reported before. In these experiments *R. oryzae* infection frequently caused rhinocerebral zygomycosis causing a 90% mortality of the infected animals within 3 days following the infection. *R. microsporus* caused a slower course of infection with milder consequences than *R. oryzae* and affected particularly the gastrointestinal areas. The survival rate was about 50% at 7.5 days after infection.
- The genome database of *R. oryzae* contains four catalase homologous genes. Specific primers were designed to the upstream and downstream regions of the genes. Then the genes were amplified from the genomic DNA of the fungus and cloned into plasmid. To investigate the role of the four catalases in the pathogenicity, transformation vectors were constructed for deletion of the genes. The vectors carried the *pyrG* selection marker gene inserted in the catalase genes. The transformation experiments using the deletion vectors are currently in progress.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- ABE A, ASANO K, SONE T (2010) A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 74 (7): 1325–31.
- ABE F, INABA H, KATOH T, HOTCHI M (1990) Effects of iron and desferrioxamine on *Rhizopus* infection. *Mycopathologia* 110: 87–91.
- ADAM RD, HUNTER G, DITOMASSO J, COMERCI G JR (1994) Mucormycosis: emerging prominence of cutaneous infections. *Clin Infect Dis* 19: 67–76.
- AL-ASIRI RH, VAN DIJKEN PJ, MAHMOOD MA, AL-SHAHED MS, ROSSI ML, OSOBA AO. (1996) Isolated hepatic mucormycosis in an immunocompetent child. *Am J Gastroenterol* 91: 606–607.
- ALFONSO-PRIETO M, BOROVIK A, CARPENA X, MURSHUDOV G, MELIK-ADAMYAN W, FITA I, ROVIRA C, LOEWEN PC (2007) The structures and electronic configuration of compound intermediates of *Helicobacter pylori* and *Penicillium vitale* catalases determined by x-ray crystallography and qm/mm density functional theory calculations. *J Am Chem Soc* 129 (14): 4193–4205.
- AL AKHRASS F, DEBIANE L, ABDALLAH L, BEST L, MULANOVICH V, ROLSTON K, KONTOYIANNIS DP (2011) Palatal mucormycosis in patients with hematologic malignancy and stem cell transplantation. *Med Mycol.* 49 (4): 400–405.
- ANAND V, ALEMAR G, GRISWOLD JR. J (1992) Intracranial complications of mucormycosis: an experimental model and clinical review. *Laryngoscope* 102: 656–662.
- ANDREOLETTI P, GAMBARELLI S, SAINZ G, STOJANOFF V, WHITE C, DESFONDS G, GAGNON J, GAILLARD J, JOUVE HM (2001) Formation of a tyrosyl radical intermediate in *Proteus mirabilis* catalase by directed mutagenesis and consequences for nucleotide reactivity. *Biochemistry* 40: 13734–13743.
- ANDREOLETTI P, MOUESCA JM, GOUET P, JAQUINOD M, BLANDIN CC, JOUVE H (2009) Verdoheme formation in *Proteus mirabilis* catalase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790: 741–753.
- ANDREOLETTI P, SAINZ G, JAQUINOD M, GAGNON J, JOUVE HM (2003) High-resolution structure and biochemical properties of a recombinant *Proteus mirabilis* catalase depleted in iron. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 50: 261–271.
- ARCE-SALINAS CA, PÉREZ-SILVA E (2010) Mucormycosis complications in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19 (8): 985–988.
- ARX JA von. (1983) On Mucoraceae s. str. and other families of the Mucorales. *Sydowia* 35, 10–26.
- AUFFRAY C, IMBEAUD S, ROUX-ROUQUIÉ M, HOOD L (2003) From functional genomics to systems biology: concepts and practices. *C R Biol* 326(10–11):879–92.
- BAKER RD, COOK CO, GOODWIN DC (2004) Properties of catalase–peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 833–839.
- BEER MA AND TAVAZOIE S (2004): Predicting Gene Expression from Sequence. *Cell* 117 (2): 185–198.
- BENDTSSEN JD, NIELSEN H, VON HEIJNE G, BRUNAK S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783–795.

- BINDER M AND HIBBETT DS (2002) Higher-level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 76–90.
- BENITO EP, DÍAZ-MÍNGUEZ JM, ITURRIAGA EA, CAMPUZANO EA, ESLAVA AP (1992) Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides* pyrG gene encoding orotidine-50-monophosphate decarboxylase: use of pyrG for homologous transformation. *Gene* 116:59–67.
- BERNROITNER M, ZAMOCKY M, FURTMÜLLER PG, PESCHEK GA, OBINGER C (2009) Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *Journal of Experimental Botany* 60 (2): 423–440.
- BOELAERT J, VAN CUTSEM J, DE LOCHT M, SCHNEIDER Y (1994) Deferoxamine augments growth and pathogenicity of *Rhizopus*, while hydroxypyridinone chelators have no effect. *Kidney Int* 45: 667–671.
- BOELAERT J, DE LOCHT M, VAN CUTSEM J, KERRELS V, CANTINIEAUX B, VERDONCK A, VAN LANDUYT HW, SCHNEIDER YJ (1993) Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore mediated infection. In vitro and in vivo animal studies. *J Clin Invest* 91: 1979–1986.
- BOROVIK A, GREBENKO AI, MELIK-ADAMYAN WR (2011) X-ray investigation of *Penicillium vitale* catalase inhibited by aminotriazole. *Crystallography Reports*. 56: 590–595.
- BRAKHAGE AA, BRUNS S, THYWISSEN A, ZIPFEL PF, BEHNSEN J (2010) Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 13(4): 409–15.
- BRAVO J, VERDAGUER N, TORMO J, BETZEL C, SWITALA J, LOEWEN PC, FITA I. (1995) Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 15; 3 (5): 491–502.
- BRUSIC V AND ZELEZNIKOW J (1999) Computational Binding Assays of Antigenic Peptides. *Lett Pept Sci* 6: 313–324.
- BUTLER SO, BTAICHE IF, ALANIZ C (2005) Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients. *Pharmacotherapy* 25(7):963–76.
- CAMELE I, DE FEO V, ALTIERI L, MANCINI E, DE MARTINO L, LUIGI RANA G (2010) An attempt of postharvest orange fruit rot control using essential oils from Mediterranean plants. *J Med Food*. 13 (6): 1515–23.
- CARPENA X, SORIANO M, KLOTZ MG, DUCKWORTH HW, DONALD LJ, MELIK-ADAMYAN , FITA I, LOEWEN PC (2003) Structure of the clade 1 catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 50: 423–436.
- CARR EJ, SCOTT P, GRADON JD. (1999) Fatal gastrointestinal mucormycosis that invaded the postoperative abdominal wall wound in an immunocompetent host. *Clin Infect Dis* 29: 956–957.
- CAVALIER-SMITH T (2002a) The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 7–76.
- CAVALIER-SMITH T (2002b) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 297–354.

- CHAMILOS G, LEWIS RE, KONTOYIANNIS DP (2007) Multidrug-resistant endosymbiotic bacteria account for the emergence of zygomycosis: a hypothesis. *Fung Genet Biol* 44: 88–92.
- CHANG YC, SEGAL BH, HOLLAND SM, MILLER GF AND KWON-CHUNG KJ (1998) Virulence of catalase-deficient *Aspergillus nidulans* in $\text{p47}^{\text{phox-/-}}$ mice. *J Clin Invest* 101: 1843–1850.
- CHAYAKULKEEREE M, GHANNOUM MA AND PERFECT JR (2006) Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25: 215–229.
- CHELIKANI P, CARPENA X, FITA I, LOEWEN PC (2003) An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *J Biol Chem* 278 (33): 31290–31296.
- CORBEL M AND EADES S (1977a) Cerebral mucormycosis following experimental inoculation with *Mortierella wolfii*. *Mycopathologia* 60 (3): 129–133.
- CORBEL M AND EADES S (1977b) Experimental mucormycosis in congenitally athymic (nude) mice. *Mycopathologia* 62 (2): 117–120.
- CORBEL M AND EADES S (1991) Observations on the experimental pathogenicity and toxigenicity of *Mortierella wolfii* strains of bovine origin. *Br Vet J* 147 (6): 504–516.
- CSOMOR J, NIKOLOVA R, SINKO J, REMENYI P, SZABO Z (2004) Mucormycosis, Article in *Hungarian* 145 (50): 2507–2513.
- DEISSEROTH A AND DOUNCE A (1970) Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol Rev* 50: 319–326.
- DIAMOND RD AND CLARK RA (1982) Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils in vitro. *Infect Immun* 38:487–495.
- DIAZ A, HORJALES E, RUDINO-PINERA E, ARREOLA R, HANSBERG W (2004) Unusual cysteine covalent bond in a large catalase. *J.Mol.Biol.* 342 (3): 971–985.
- DIAZ A, VALDES V, RUDINO-PINERA E, HORJALES E, HANSBERG W (2008) Structure–function relationships in fungal large-subunit catalases. *J Mol Biol* 386, 218–232.
- DO CB, MAHABHASHYAM MSP, BRUDNO M, BATZOGLOU S (2005) PROBCONS: Probabilistic Consistency-based Multiple Sequence Alignment. *Genome Research* 15, 330–340.
- EINSELE H, HEBART H, ROLLER G, LOFFLER J, ROTHENHOFER I, MULLER CA, BOWDEN RA, VAN BURIK J, ENGELHARD D, KANZ L AND SCHUMACHER U (1997) Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 35: 1353–1360.
- ELLIS JJ (1985) Species and varieties in the *Rhizopus arrhizus*–*Rhizopus oryzae* group as indicated by their DNA complementarity. *Mycologia* 77: 243–247.
- ELLIS JJ (1986) Species and varieties in the *Rhizopus microsporus* group as indicated by their DNA complementarity. *Mycologia* 78: 508–510.
- ESPINEL-INGROFF A, OAKLEY LA, KERKERING TM (1987) Opportunistic zygomycotic infections. A literature review. *Mycopathologia* 97: 33–41.
- EUCKER J, SEZER O, GRAF B, POSSINGER K (2001) Mucormycoses. *Mycoses* 44: 253–260.
- EUCKER J, SEZER O, LEHMANN R, WEBER JR, GRAF B, DENKERT C, BRÜCK W,

- SCHWEIGERT M, POSSINGER K (2000) Disseminated mucormycosis caused by *Absidia corymbifera* leading to cerebral vasculitis. *Infection* 28: 246–250.
- FENG XM, PASSOTH V, EKLUND–JONSSON C, ALMINGER ML, SCHNÜRER J (2006) *Rhizopus oligosporus* and yeast co-cultivation during barley tempeh fermentation—Nutritional impact and real-time PCR quantification of fungal growth dynamics. *Food Microb* 24 (4): 393–402.
- FERGUSON BJ (2000) Mucormycosis of the nose and paranasal sinuses. *Otolaryngol Clin North Am* 33: 349–365.
- FINGEROTH JD, ROTH RS, TALCOTT JA, RINALDI MG (1994) Zygomycosis due to *Mucor circinelloides* in a neutropenic patient receiving chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Clin Infect Dis* 19: 135–137.
- FITA I AND ROSSMANN MG (1985) The NADPH binding site on beef liver catalase. *Biochemistry* Vol. 82: pp. 1604–1608.
- FLOWER DR (2003): Towards in Silico Prediction of Immunogenic Epitopes. *Trends in Immunology* 24 (12): 667–674.
- FOROUGH LM, KANG YN, MATZGER AJ (2011) Polymer-induced heteronucleation for protein single crystal growth: structural elucidation of bovine liver catalase and concanavalin a forms. *Cryst Growth Des* 11: 1294.
- FUKUMORI Y, FUJIWARA T, OKADA–TAKAHASHI Y, MUKOHATA Y, YAMANAKA T (1985) Purification and Properties of a Peroxidase from *Halobacterium halobium* L–33. *J. Biochem* 98: 1055–1061.
- FRANKENBERG L, MYRIAM BRUGNA M, HEDERSTEDT L (2002) *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. *Journal of bacteriology* 184. (22): 6351–6356.
- FREIFELD AG AND IWEN PC (2004) Zygomycosis. *Semin Respir Crit Care Med* 25: 221–232.
- GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, DUVAUD S, WILKINS MR, APPEL RD, BAIROCH A (2005) *Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server*. In: Walker JM (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, pp. 571–607.
- GHANNOUM MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13(1): 122–143.
- GONZALEZ CE, COURIEL DR, WALSH TJ (1997) Disseminated zygomycosis in a neutropenic patient: successful treatment with amphotericin B lipid complex and granulocyte colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis* 24: 192–196.
- GONZALEZ CE, RINALDI MG, SUGAR AM (2002) Zygomycosis. *Infect Dis Clin North Am*. 16: 895–914.
- GOUET P, JOUVE H-M, DIDEBERG O (1995). Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. *J Mol Biol* 249:933–954.
- GOULD SJ, KELLER G–A, SUBRAMANI S (1988) Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol* 107: 897–905.
- GREENBERG RN, SCOTT LJ, VAUGHN HH, RIBES JA (2004) Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments. *Curr Opin Infect Dis* 17: 517–25.

- GIULIANI A, METTIMANO M, VIVIANI D, SCAGLIUSI A, BRUNO A, RUSSO A, ROTOLI M, SAVI L. (2010) An uncommon case of systemic Mucormycosis associated with spinal cord infarction in a recently diagnosed diabetic. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 23(1):355–8.
- HAGENSEE ME, BAUWENS JE, KJOS B, BOWDEN RA (1994) Brain abscess following marrow transplantation: experience at the Fred Hutchinson Cancer Research Center. 1984–92. *Clin Infect Dis* 19: 402–408.
- HARA I, ICHISE N, KOJIMA K, KONDO H, OHGIYA S, MATSUYAMA H, YUMOTO I (2007) Relationship between the size of the bottleneck 15 Å from iron in the main channel and the reactivity of catalase corresponding to the molecular size of substrates. *Biochemistry* 46: 11–22.
- HASENBERG M, BEHNSEN J, KRAPPMANN S, BRAKHAGE A, GUNZER M. (2011) Phagocyte responses towards *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* 301(5): 436–44.
- HEMASHETTAR BM, PATIL RN, O'DONNELL K, CHATURVEDI V, REN P, PADHYE AA (2011) Chronic rhinofacial mucormycosis caused by *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) in India. *J Clin Microbiol* 49(6): 2372–2375.
- HISADA H, HATA J, KAWATO A, ABE Y, AKITA O (2005) Cloning and Expression Analysis of Two Catalase Genes from *Aspergillus oryzae*. *J of Biosc. Of Bioengi.* 99 (6): 562–568.
- HONDA A, KAMEI K, UNNO H, HIROSHIMA K, KURIYAMA T, MIYAJI M (1999) A murine model of zygomycosis by *Cunninghamella bertholletiae*. *Mycopathologia* 144: 141–146.
- HUMPHREY W, DALKE A AND SCHULTEN K (1996) "VMD – Visual Molecular Dynamics", *J Molec Graphics* 14 pp. 33–38.
- IBRAHIM AS (2011) Host cell invasion in mucormycosis: role of iron. *Curr Opin Microbiol.* (4):406–411.
- IBRAHIM AS AND SKORY CD (2006) Genetic manipulation of zygomycetes. In: Kavanagh K (Ed) *Medical Mycology, Cellular and Molecular Techniques*. New York, NY: John Wiley & Sons, p 305–325.
- IBRAHIM AS, GEBERMARIAM T, FU Y, LIN L, HUSSEINY MI, FRENCH SW, SCHWARTZ J, SKORY CD, EDWARDS JE, SPELLBERG BJ (2007) The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J Clin Invest* 117(9): 2649–2657.
- INGHAM A, GILBERT JD, BYARD RW (2010) Disseminated fungal infection with renal infarction simulating homicide. *Am J Forensic Med Pathol.* 31(4):390–392.
- ITURRIAGA EA, DIAZ-MINGUEZ JM, BENITO EP, ALVAREZ MI, ESLAVA AP (1992) Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus leu1* gene. *Curr Genet* 21: 215–223.
- JENSEN H, AALBK B, HAU J (1995) Induction of systemic zygomycosis in pregnant mice by *Absidia corymbifera*. *Lab Anim Sci* 45 (3): 254–257.
- JENSEN H, FRANDSEN P, SCHONHEYDER H (1993) Experimental systemic bovine zygomycosis with reference to pathology and secretion of antigen into urine. *Zentralbl Veterinarmed* 40 (1): 55–65.

- JHA V, LOUIS S, CHELIKANI P, CARPENA X, DONALD LJ, FITA I, LOEWEN PC (2011) Modulation of heme orientation and binding by a single residue in catalase HP11 of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 50 (12): 2101–2110.
- KAMEI K (2001) Animal models of Zygomycosis – *Absidia*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Cunninghamella*. *Mycopathologia* 152: 5–13.
- KAWASAKI L AND AGUIRRE J (2001) Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 183 (4): 1434–1440.
- KAWASAKI L, WYSONG D, DIAMOND R, AGUIRRE J (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* 179 (10): 3284–3292.
- KIM AJ, CHOI JN, KIM J, PARK SB, YEO SH, CHOI JH, LEE CH (2010) GC–MS based metabolite profiling of rice Koji fermentation by various fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* 74 (11): 2267–72.
- KLOTZ MG, KLASSEN GR, LOEWEN PC (1997) Phylogenetic Relationships Among Prokaryotic and Eukaryotic Catalases. *Molec Biol Evol* 14 (9): 951–958.
- KLOTZ MG AND LOEWEN PC (2003) The Molecular Evolution of Catalatic Hydroperoxidases: Evidence for Multiple Lateral Transfer of Genes Between Prokaryota and from Bacteria into Eukaryota. *Molec Biol Evol* 20 (7): 1098–1112.
- KOLOTLA MP AND DIAMOND RD (1990) Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO–1. *Infect Immun.* 58 (5): 1174–9.
- KO TP, SAFO MK, MUSAYEV FN, DI SALVO ML, WANG C, WU SH, ABRAHAM DJ (2000) Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 56 (2): 241–245.
- LANTERNIER F, DANNAOUI E, MORIZOT G, ELIE C, GARCIA–HERMOSO D, HUERRE M, BITAR D, DROMER F, LORTHOLARY O; FRENCH MYCOSIS STUDY GROUP (2012) A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis* 54 (S1):S35–43.
- LASKOWSKI RA, MACARTHUR MW, MOSS DS, THORNTON JM (1993). PROCHECK – a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J App Cryst* 26: 283–291.
- LI Q, MCNEIL B, HARVEY LM (2008) Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1–D. *Free Radical Biology & Medicine* 44: 394–402.
- LITTLECHILD J (1999) Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 28–34.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25: 402–408.
- LOEW O (1901) Repts. Dept. Agric. Washington 68:47.
- LOEWEN PC, SWITALA J, TRIGGS–RAINE BL (1985) Catalases HP1 and HP11 in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch Biochem Biophys* 243: 144–149.
- LUKÁCS GY, PAPP T, SOMOGYVÁRI F, CSERNETICS Á, NYILASI I, VÁGVÖLGYI Cs (2008) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

- gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Ant Leeuwenhoek* 95 (1): 55–64.
- MA LJ, IBRAHIM AS, SKORY C, GRABHERR MG, BURGER G, BUTLER M, ELIAS M, IDNURM A, LANG BF, SONE T, ABE A, CALVO SE, CORROCHANO LM, ENGELS R, FU J, HANSBERG W, KIM JM, KODIRA CD, KOEHRSEN MJ, LIU B, MIRANDA-SAAVEDRA D, O'LEARY S, ORTIZ-CASTELLANOS L, POULTER R, RODRIGUEZ-ROMERO J, RUIZ-HERRERA J, SHEN YQ, ZENG Q, GALAGAN J, BIRREN BW, CUOMO CA, WICKES BL (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genetics* 5 (7): e1000549.
- MAERTENS J, DEMUYNCK H, VERBEKEN EK, ZACHEE P, VERHOEF GE, VANDENBERGHE P, BOOGAERTS MA (1999) Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. *Bone Marrow Transplant* 24: 307–312.
- MALLIS A, MASTRONIKOLIS SN, NAXAKIS SS, PAPADAS AT (2010) Rhinocerebral mucormycosis: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 14(11):987–92.
- MATEJ MJ, SEVINC MS, HU B, BUJONS J, BRAVO J, SWITALA J, ENS W, LOEWEN PC, FITA I (1999a) Mutants that alter the covalent structure of catalase hydroperoxidase II from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* Vol 274. 39: 27717–27725.
- MATEJ MJ, ZAMOCKY M, NYKYRI LM, HERZOG C, ALZARI PM, BETZEL C, KOLLER F, FITA I (1999b) Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 268: 135–149.
- MATHUR S.C, FRIEDMAN HD, KENDE A.I, DAVIS RI, GRAZIANO SL (1999) Cryptic *Mucor* infection leading to massive cerebral infection at initiation of antileukemic chemotherapy. *Ann Haematol* 78: 241–245.
- MELIK-ADAMYAN W, BRAVO J, CARPENA X, SWITALA J, MATEJ MJ, FITA I, LOEWEN PC (2001) Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HP II from *Escherichia coli*. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 44: 270–281.
- MICHAILIDES TJ (1991) Characterization and comparative studies of *Mucor* isolates from stone fruits from California and Chile. *Plant Dis*. 75: 373–380.
- MICHELSE CB, SALIM K, RAGAS P, RAM AFJ, KUDLA B, JARRY B, PUNT PJ, VAN DEN HONDEL CAMJJ (2004) Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Mol Genet Genomics* 271: 499–510.
- MURSHUDOV GN, GREBENKO AI, BRANNIGAN JA, ANTON AA, BARYNIN VV, DODSON GG, DAUTER Z, WILSON KS, MELIK-ADAMYAN WR (2002) The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Cryst. D* 58: 1972–1982.
- MURSHUDOV GN, MELIK-ADAMYAN WR, GREBENKO AI, BARYNIN VV, VAGIN AA, VAINSHTEIN BK, DAUTER Z, WILSON KS (1992) Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution. *FEBS* 11667 Vol.312; 2,3:127–131.
- NAVARRO RE, STRINGER MA, HANSBERG W, TIMBERLAKE WE, AGUIRRE J (1996) *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet*. 29 (4): 352–359.

- NICHOLS L, OCQUE RZ, DALY I (2011) Zygomycosis Associated with HIV Infection and Liver Transplantation. *Patholog Res Int.* 23;2011:545981.
- NIRMALA SV, LALITHA V, SIVAKUMAR N, KUMAR KK, SRIKANTH M (2011) Mucormycosis associated with juvenile diabetes. *J Indian Soc Pedod Prev.* 29(6 Suppl 2):S87–91.
- NUCCI M (2003) Emerging moulds: *Fusarium*, *Scedosporium* and Zygomycetes in transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis* 16: 607–612.
- PAGANO L, RICCI P, TONSO A, NOSARI A, CUDILLO L, MONTILLO M, CENACCHI A, PACILLI L, FABBIANO F, DEL FAVERO A (1997) Mucormycosis in patients with haematological malignancies: a retrospective clinical study of 37 cases GIMEMA Infection Program (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto). *Br J Haematol.* 99: 331–336.
- PAGNI M, IOANNIDIS V, CERUTTI L, ZAHN–ZABAL M, JONGENEEL CV, HAU J, MARTIN O, KUZNETSOV D, FALQUET L (2007) MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W 433–W437.
- PARIS S, WYSONG D, DEBEAUPUIS JP, SHIBUYA K, PHILIPPE B, DIAMOND RD, LATGE JP (2003) Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 71, 3551–3562.
- PARTIDA–MARTINEZ LP AND HERTWECK C (2005) Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437: 884–888.
- PARTIDA–MARTINEZ LP, DE LOOß CF, ISHIDA K, ISHIDA M, ROTH M, BUDER K AND HERTWECK C (2007) Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the Zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Appl Environ Microbiol* 73: 793–797.
- PASSARDI F, THEILER G, ZAMOCKY M, COSIO C, ROUHIER N, TEIXERA F, MARGIS–PINHEIRO M, IOANNIDIS V, PENEL C, FALQUET L, DUNAND C (2007a) PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry* 68: 1605–1611.
- PASSARDI F, ZAMOCKY M, FAVET J, JAKOPITSCH C, PENEL C, OBINGER C, DUNAND C (2007b) Phylogenetic distribution of catalaseperoxidases: are there patches of order in chaos. *Gene* 397: 101–113.
- PENYA–SOLER E, VEGA MC, WILMANNS M, WILLIAMS CP (2011) Structural features of peroxisomal catalase from the yeast *Hansenula polymorpha*. *Acta Crystallogr Sect D* 67 p.690.
- PETER C, LOEWEN PC, CARPENA X, ROVIRA C, IVANCICH A, PEREZ–LUQUE R, HAAS R, ODENBREIT S, NICHOLLS P, FITA I (2004) Structure of *Helicobacter pylori* catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 Å resolution. *Biochemistry* 43: 3089–3103.
- PETERSON KL, WANG M, CANALIS RF, ABEMAYOR E (1997) Rhinocerebral mucormycosis: evolution of the disease and treatment options. *Laryngoscope* 107: 855–862.
- PHILLIPS JC, BRAUN R, WANG W, GUMBART J, TAJKHORSHID E, VILLA E, CHIPOT C, SKEEL RD, KALE L, SCHULTEN K (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 26: 1781 – 1802.
- PURWAR N, MCGARRY JM, KOSTERA J, PACHECO AA, SCHMIDT M (2011) Interaction of nitric oxide with catalase: structural and kinetic. Analysis. *Biochemistry* 50: 4491–4503.

- PUTNAM CD, ARVAI AS, BOURNE Y, TAINER JA (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296: 295–309.
- RABIE CJ, LÜBBEN A, SCHIPPER MAA, VAN HEERDEN FR, FINCHAM JE (1985) Toxigenicity of *Rhizopus* species. *Int J Food Mic* 1: 263–270.
- RANGEL–GUERRA RA, MARTINEZ HR, SAENZ C, BOSQUES–PADILLA F, ESTRADA–BELLMANN I (1996) Rhinocerebral and systemic mucormycosis: clinical experience with 36 cases. *J Neurol Sci* 143: 19–30.
- REIMUND E AND RAMOS A (1994) Disseminated neonatal gastrointestinal mucormycosis: a case report and review of the literature. *Pediatr Pathol* 14: 385–389.
- REINHARDT D, LICATA I, KAPLAN W, AJELLO L, CHANDLER F, ELLIS J (1981) Experimental cerebral zygomycosis in alloxan–diabetic rabbits: variation in virulence among zygomycetes. *Sabouraudia* 19: 245–255.
- REYES HM, TINGLE EJ, FENVES AZ, SPIEGEL J, BURTON EC (2008) Pulmonary invasive mucormycosis in a patient with secondary iron overload following deferoxamine therapy. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 21(4):378–81.
- RIBES JA, VANOVER–SAMS CL, BAKER DJ (2000) Zygomycetes in Human Disease. *Clin Microbiol Rev* 13: 236–301.
- Rhizopus oryzae* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (2004) <http://www.broad.mit.edu>
- RIISE EK, LORENTZEN MS, HELLAND R, SMALÅS SO, LEIROS HKS, WILLASSEN NP (2007) The first structure of a cold–active catalase from *Vibrio salmonicida* at 1.96 Å reveals structural aspects of cold adaptation. *Acta Cryst D* 63: 135–148.
- ROBBERTSE B, YODER OC, NGUYEN A, SCHOCH CL, TURGEON BG (2003) Deletion of all *Cochliobolus heterostrophus* monofunctional catalase–encoding genes reveals a role for one in sensitivity to oxidative stress but none with role in virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1013–1021.
- RODEN MM, ZAOUTIS TE, BUCHANAN WL, KNUDSEN TA, SARKISOVA TA, SCHAUFEL RL, SEIN M, SEIN T, CHIOU CC, CHU JH, KONTOYIANNIS DP, WALSH TJ. (2005) Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 41 (5): 634–653.
- RONQUIST F AND HUELSENBECK JP (2003) *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- ROUHIER N AND JACQUOT JP (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 1413–1421.
- RUIZ–ALBERT J, CERDÁ–OLMEDO E, CORROCHANO LM (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Mol Genet Genomics* 266 (5): 768–77.
- ŠALI A AND BLUNDELL TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779–815.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SCHONBAUM GR, KING TS, MASON HS, MORRISON M. (1982) Oxidases and Related Redox Systems. Pergamon Press pp. 671–684.

- SCHIPPER MAA (1984) A revision of the genus *Rhizopus*. I The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. Stud Mycol 25: 1–19.
- SHIBUYA K, PARIS S, ANDO T, NAKAYAMA H, HATORI T, LATGÉ JP (2006) Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. Jpn. J Med Mycol 47 (4): 249–255.
- SINGH N (2001) Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. Clin Infect Dis 33: 1692–1696.
- SKORY CD (2002) Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. Mol Genet Genomics 268: 397–406.
- SMITHERMAN KO AND PEACOCK JE (1995) Infections emergencies in patients with diabetes mellitus. Med Clin N Am 79: 53–77.
- SMITH WL, MOLINE HE, JOHNSON KS (1979) Studies with *Mucor* species causing postharvest decay of fresh produce. Phytopathology 69: 865–869.
- SONDHI J, GUPTA P, SOOD N (1998–1999) Experimental zygomycosis in rabbits: clinicopathological studies. Mycopathologia 144 (1): 29–37.
- SONDHI J, GUPTA P, SOOD N (2000) Effect of immunosuppression on the clinicopathological changes in experimental zygomycosis in rabbits. Vet Res Commun 24 (4): 213–227.
- SODHI M, KHANNA R, CHAND P (1996) Experimental *Absidia corymbifera* infection in rabbits: Clinicopathological studies. Mycopathologia 134: 7–11.
- SODHI M, KHANNA R, SADANA J, CHAND P (1998) Experimental *Absidia corymbifera* infection in rabbits: sequential pathological studies. Mycopathologia 143: 25–31.
- SPELLBERG B, FU Y, EDWARDS JE JR, IBRAHIM AS (2005) Combination therapy with amphotericin B lipid complex and caspofungin acetate of disseminated zygomycosis in diabetic ketoacidotic mice. Antimicrob Agents Chemother 49: 830–832.
- SPELLBERG B, IBRAHIM AS, CHIN-HONG PV, KONTOYIANNIS DP, MORRIS MI, PERFECT JR, FREDRICKS D, BRASS EP (2012) The Deferasirox–AmBisome Therapy for Mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. J Antimicrob Chemother 67(3):715–22.
- STEYN PS, TUINMANN AA, HEERDEN FR van, ROOYEN PL van, WESSELS PL, RABIE CJ (1983) The isolation, structure and absolute configuration of the mycotoxin rhizonin A, a novel cyclic heptapeptide containing *N*-methyl-3-(3-furyl) alanine, produced by *Rhizopus microsporus*. J Chem Soc Chem Commun pp 47–49.
- SUBRAMANI S (1993) Protein import into peroxisomes and the biogenesis of the organelle. Annu. Rev Cell Biol 9: 445–478.
- SUGAR A, LIU X (2000) Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: role of quinolones and azoles. Antimicrob Agents Chemother 44 (7): 2004–2006.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acid Res 22: 4673–4680.

- TOBON AM, ARANGO M, FERNANDEZ D, RESPETRO A (2003) Mucormycosis (zygomycosis) in a heart–kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. *Clin Infect Dis* 36: 1488–1491.
- TORMO J, FITA I, SWITALA J, LOEWEN PC (1990) Crystallization and preliminary X–ray diffraction analysis of catalase HPII from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 213; (2): 219–220.
- TEDDER M, SPRATT JA, ANSTADT MP, HEDGE SS, TEDDER SD, LOWE JE (1994) Pulmonary mucormycosis: results of medical and surgical therapy. *Ann Thorac Surg* 57: 10044–1050.
- VÁGVÖLGYI CS, HEINRICH H, ÁCS K, PAPP T (2004) Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Ant Leeuwenhoek* 86: 181–188.
- VAN CUTSEM J AND BOELAERT J (1989a) Effect of deferoxamine, feroxamine and iron on experimental mucormycosis (zygomycosis). *Kidney Int* 36: 1061–1068.
- VAN CUTSEM J, FRANSEN J, JANSSEN P (1988) Experimental zygomycosis due to *Rhizopus* spp. infection by various routes in guinea pigs, rats and mice. *Mycoses* 31: 563–578.
- VAN CUTSEM J, VAN DERVEN F, FRANSEN J, JANSSEN P (1989b) Treatment of experimental zygomycosis in guinea pigs with azoles and with amphotericin B. *Chemotherapy* 35: 267–272.
- VAN DEN SAFFELE JK AND BOELAERT JR (1996) Zygomycosis in HIV–positive patients: a review of the literature. *Mycoses* Volume 39, Issue 3–4 p 77–84.
- VAN HEESWIJCK R AND RONCERO MIG (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Calsberg Res Commun* 49: 691–702.
- VOIGT K, CIGELNIK E, O'DONNELL K (1999) Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal–DNA sequence data. *J Clin Microbiol* 37: 3957–3964.
- WALDORF AR, DIAMOND R (1984) Cerebral mucormycosis in diabetic mice after intrasinus challenge. *Infect Immun* 44 (1): 194–195.
- WALDORF AR, HALDE C, VEDROS N (1982) Murine model of pulmonary mucormycosis in cortisone–treated mice. *Sabouraudia* 20: 217–224.
- WALDORF AR, RUDERMAN N AND DIAMOND RD (1984) Specific susceptibility to mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar defense against *Rhizopus*. *J Clin Investig* 74: 150–160.
- WALSH TJ AND GROLL AH (1999) Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty–first century. *Transpl Infect Dis* 1: 217–261.
- WALSH TJ, GMALETSOU MN, MCGINNIS MR, HAYDEN RT, KONTOYIANNIS DP (2012) Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin Infect Dis* 54 (S1):S55–60.
- WALSH TJ, GROLL A, HIEMENZ J, FLEMING R, ROILIDES E, ANAISSIE E (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 10(S1): 48–66.

- WELINDER KG (1991) Bacterial catalase–peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta* 1080: 215–220.
- WELINDER KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2: 388–393.
- WHITTAKER MM, BARYNIN VV, IGARASHI T, WHITTAKER JW (2003) Outer sphere mutagenesis of *Lactobacillus plantarum* manganese catalase disrupts the cluster core. *Eur J Biochem* 270: 1102–1116.
- WILSON T, RABIE CJ, FINCHAM JE, STEYN PS, SCHIPPER MA (1984) Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus* in laboratory animals. *Food Chem Toxicol* 22: 275–281.
- WOODBURY W, SPENCER AK AND STANMANN MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Anal Biochem* 44: 301–305.
- WYSONG DR, CHRISTIN L, SUGAR AM, ROBBINS PW, DIAMOND RD (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.* 66: 1953–1961.
- ZAMOCKY M, FURTMÜLLER PG, OBINGER C (2008a) Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants and Redox Signaling* 10: 1527–1547.
- ZAMOCKY M, JAKOPITSCH C, FURTMÜLLER PG, DUNAND C, OBINGER C (2008b) The peroxidase–cylooxygenase superfamily: reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins* 71: 589–605.
- ZAMOCKY M AND KOLLER F (1999) Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 72:19–66.
- ZAMOCKY M, REGELSBERGER G, JAKOPITSCH C, OBINGER C (2001) The molecular peculiarities of catalaseperoxidases. *FEBS Lett* 492: 177–182.
- ZAVASKY M, SAMOWITZ W, LOFTUS T, SEGAL H, CARROLL K. (1999) Gastrointestinal zygomycotic infection caused by *Basidiobolus ranarum*: case report and review. *Clin Infect Dis* 28: 1244–8.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Papp Tamásnak**, hogy munkámat mindvégig támogatta, és figyelemmel kísérte, értékes elméleti és gyakorlati útmutatásával minden segítséget megadott munkám sikeres elvégzéséhez.

Köszönöm **Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba** Tanszékvezető úrnak az áldozatos munkát, mellyel lehetővé tette dolgozatom elkészítését, valamint a nélkülözhetetlen szakmai ismereteket.

Külön köszönet illeti **Dr. Ötvös Ferencet** a 3D molekulamodellezésben nyújtott önzetlen segítségéért, a lelkesítő beszélgetésekért és barátságáért.

Köszönet illeti **Dr. Szakonyi Gerdát** és **Dr. Benyhe Sándort** dolgozatom elkészítés során nyújtott segítségükért, támogatásukért.

Külön szeretném megköszönni **Dr. Rakonczay Zoltánnak** az állatkísérletekben nyújtott önzetlen segítséget.

Hálával tartozom **Dr. Lukács Gyöngyinek** és **Dr. Nyilasi Ildikónak**, akik bevezettek a molekuláris biológia rejtelseibe és megosztották velem gyakorlati ismereteiket tanulmányaim kezdetén. Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak: **Bencsik Ottónak**, **Dr. Csernetics Árpádnak**, **Krizsán Krisztinának**, **Dr. Nagy Lászlónak**, **Németh Tibornak**, **Papp Csabának**, **Petkovits Tamásnak** és **Dr. Takó Miklósnak** a munkám során nyújtott segítségüket. Külön köszönöm **Dr. Pál Károlynak**, **Nagy Gábornak**, **Farkas Elvirának**, **Terbe Ildikónak**, **Dr. Péteri Zsanettnek**, **Dr. Lipinszki Zoltánnak**, **Winter Zoltánnak** barátságukat, önzetlen segítségüket és a lelki támogatást, amellyel gyakran adtak erőt munkám folytatásához.

Köszönetemet fejezem ki **Lele Máriának** és **Deákné Kulcsár Melindának** a munkám során nyújtott technikai segítségért, valamint **Dr. Palágyi Andrásnének**, **Kardos Zsuzsannának**, **Szőnyi Jánosnének**, **Börcsök Irénnek**, hogy a munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyeket intézték, valamint a Mikrobiológiai Tanszék összes dolgozójának önzetlen segítségükért.

Köszönettel tartozom **Dr. Faludi Ildikónak** a sok hasznos szakmai és baráti beszélgetésért és támogatásért.

Barátaimnak köszönöm bátorításukat és kitartó jelenlétüket.

Drága Édesanyámnak, **Családomnak** és **Testvéremnek** köszönöm, hogy egész életem folyamán megértéssel és önzetlen segítséggel támogattak, és mindvégig mellettem álltak és mindenben segítettek, hogy elérhessem céljaimat. Nélkülük nem sikerült volna eljutnom idáig, ezért örökre hálás leszek **Nekik**.

11. MELLÉKLETEK

1. melléklet:

H₂O₂ stressz mikrotiter lemezen folyadék tenyészetben

YEG	kontroll	0,078 mM	0,152 mM	0,312 mM	0,625 mM	1,25 mM	1,5 mM	1,75 mM	2 mM	2,5 mM	3 mM	5 mM
24 óra <i>R.o.</i>	100%	100%	100%	88%	86%	78%	57%	43%	34%	18%	8%	0%
24 óra <i>R.m.</i>	100%	100%	100%	85%	80%	68%	47%	0%	0%	0%	0%	0%
48 óra <i>R.o.</i>	100%	100%	100%	96%	92%	88%	75%	65%	55%	45%	24%	0%
48 óra <i>R.m.</i>	100%	100%	100%	88%	84%	78%	62%	9%	0%	0%	0%	0%
72 óra <i>R.o.</i>	100%	100%	100%	97%	93%	92%	85%	81%	69%	64%	39%	0%
72 óra <i>R.m.</i>	100%	100%	100%	95%	93%	86%	74%	13%	0%	0%	0%	0%

YEG tápoldatban a különböző hidrogén-peroxid koncentrációk hatása a növekedésre. *R.o.*: *R. oryzae*; *R.m.*: *R. microsporus*

YNB	kontroll	0,078 mM	0,152 mM	0,312 mM	0,625 mM	1,25 mM	1,5 mM	1,75 mM	2 mM	2,5 mM	3 mM	5 mM
24 óra <i>R.o.</i>	100%	100%	85%	80%	73%	71%	52%	39%	2%	0%	0%	0%
24 óra <i>R.m.</i>	100%	100%	81%	74%	24%	3%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
48 óra <i>R.o.</i>	100%	100%	87%	84%	78%	75%	64%	54%	14%	0%	0%	0%
48 óra <i>R.m.</i>	100%	100%	87%	80%	38%	24%	17%	5%	0%	0%	0%	0%
72 óra <i>R.o.</i>	100%	100%	89%	86%	80%	79%	74%	64%	18%	0%	0%	0%
72 óra <i>R.m.</i>	100%	100%	88%	80%	48%	39%	27%	5%	0%	0%	0%	0%

YNB és YNB + ura: tápoldatban a különböző H₂O₂ koncentrációk hatása a növekedésre *R. oryzae* és *R. microsporus* esetén.

R.o.: *R. oryzae* (YNB+ura tápoldat); *R.m.*: *R. microsporus* (YNB tápoldat)

H₂O₂ stressz petri csészében szilárd táptalajon

24 óra	kontroll	0,0625 mM	0,125 mM	0,25 mM	0,5 mM	0,75 mM	1 mM	1,5 mM	2 mM	2,5 mM	3 mM
<i>R. oryzae</i>	100%	98%	89%	79%	75%	68%	62%	60%	59%	35%	0%
<i>R. microsporus</i>	100%	95%	83%	74%	55%	39%	20%	6%	0	0	0

YNB és YNB +ura táptalajon a különböző H₂O₂ koncentrációk hatása a növekedésre *R. oryzae* és *R. microsporus* esetén.

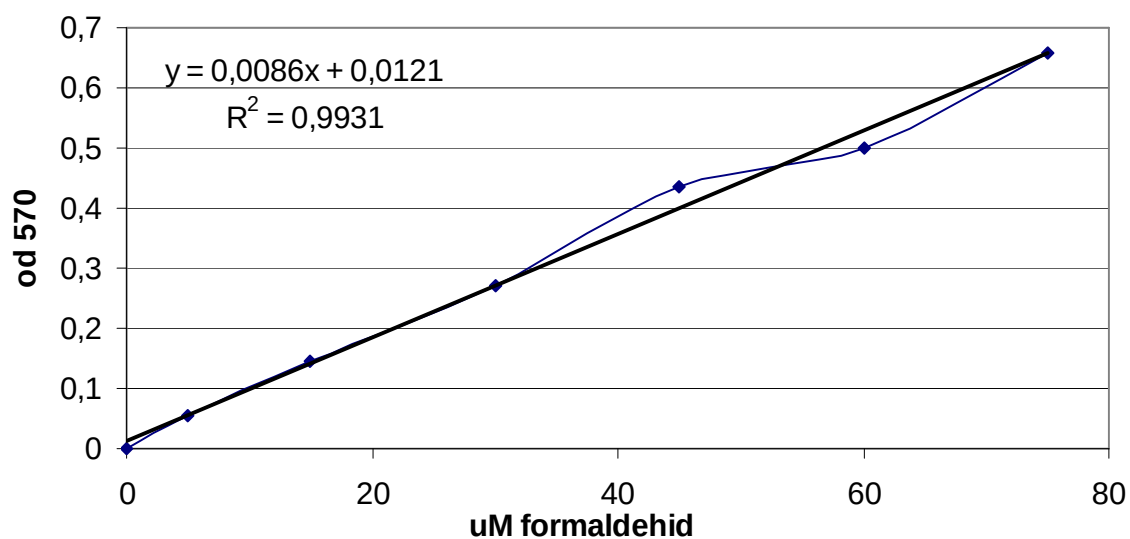
2. melléklet:

A: Formaldehid standars készítése kalibrációhoz:

100x osan hígított sormaldehid standardból készítettük:

Cső	100xhígított formaldehid (µl)	Puffer (kataláz detektáló kitt tartalmazza)	Végkoncentráció (µM formaldehid)*
A	0	1000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

*Formaldehid koncentrációja 170 µl végtérfogatú reakció közegben.

B: Kalibráció görbe

3. melléklet:**CAT1** fehérje: 484 aa

MTKNVLTSNGNPVENNQTSQTAGAWGPVLIQDFHLVDKLAHFDRERIPERVVHAKGAGAHGVFEVTNDITHL
TKAKFLSHVGKTTTPVFLRFSTVGGKEGSADTARDPRGFALKFYTEEGNWDWVGNNTPVFFIRDPSKFPDFIHT
QKRNPRTNYADPDAFWDFLSLVPESIHQVTILFSNRGTDPGYRHLNGYSSHTLKL VNDKGFEKYVKWHFKTDQ
GIKNLTAQKAGELAGSDPDYATRDLFNAIERGDYPSWSVYIQVMNPEDAKKYRFNPFDTVTKVWSHKDYPLQPV
GKLT LNRNPENYFAETEQAASFSPSHIVPGIDVSPDRMLQGRLFSYPDTHRHRLGVNYAQIPINQPQCRVSNHQ
RDGQMAVLGNNGSAPNYEPNSFSGPQQTNIAATTFTAEELGVTGRHSFTLTDDDFVQAGDLYRLMSAEKTD
LINNIARHLKNAKKHIQERQIGHFKRADPEYGRQRIEQTILALSSKA

CAT2 fehérje: 710 aa

MSNIQDKTPPVNTNVDTKIDSKGAQETTQFGVKVDSRDSL TAGERGALLMEDFVYREKMTDFDHERIPERVVHA
RGFGVHGYFQTYKDWSQLTCANFLCHPSKKTVPVFRFSTVLGNRGSPDCVRDVRGFATRFYTDEGNFDLVGNV
IAPFFVQDPSKFVDLIHAGKPEPDRDIPQAATAHNSTYDFFAQQPETTHTVLWVLSGRGTPKSFRQVEGFGVN
TFRLINEQGKWFVVKFHWKPLQGLNLEWDEAQKLGKDPDFHRNDMYSIDNGHFPEYELGVQIIP EDEEK
FEFDILDATKIWPESIIPVTILGKMVLNRPDDFFGETEQVTYHMGHVVRGIGFTDDPLLQGR LFSYIDTQIN
RMNSVNFHQLPINRPVVPVHNVNREGFMNFNCHKGAVNYFPNTMQGNTAPAAA KGGYIEVPQKINGVKQRG
KHGKKLEFYSQAQLFYNSLTAEQQQVNNFRFELGRCNNFTVRENYVLLNHVDHNLARRVANGIGVKPPEK
PDIENTKKQTSVGLSIDNYKRPNHIRGKTVAIVVAPGIDVIQANGMYKFLSDEGAVDFVGPTPGEVDGMPVVK
TFLTSPSVFYDAVFVPTGEVSTFEGLMEHPAPFYPGEPVQFVLD CYRHGKPLAVSGKAVAL LKAAHIPLVTSE
KDEIKYGLFIAENLDKLSNFKKGIIIQRFWTRLPIDPAEESPTPLDIVIED

CAT3 fehérje: 718 aa

MKKPTAIFLFI MLGCOLVSGSSDSRTAPVTDIDADVYDAGTQETTQFGVKINNTDSL TAGDRGPTLLED FMMR
EKVMHFDHERIPERAVHARGVAVHGYFQSYEDWSNITAAKFLQDPDTKTPVFRFSTVLGSRGSPDTVRDVRG
FATRFYTEEGNWDLDIAIKFPDLIHA AKPEPDKEVPQAGTAHSTAYDFFS QHTETIHTVMWALSGRGTPRSFRQ
VEGFGVHTFRFINEDKTVLVKFHWKPLQGLSNLVDEAQKIAGKDIDFHRNDLYTAIENG DYPEYELGVQIV
SEEDQDKDFDLDATKIIPESLVPVTKLGKMVLNRPDNYFSETEQVTFHPGHIVRGITFTDDPLLQGR LFS
YTD TQLNRMHSANYLQLPINRPLVPVHNNQRDGMQFN VYHGRVAYYPNALQDNTPSVSEEEGGYLEYPENI
RGRKQRGKHGKFADHFSQAQLFYNSLTTHEQQQLVNNFRFEVGKCD SKLVRQNFVDVLRVNDN LARRVARGV
GVEEPSVSENEGETTINLSIENYKRPDHIRAKKVAILTGPGIDDSQVKEMKDYLTGENAYVDLVGLN LDEDN
SEGLNITQTYSTTSSVLYDAVYVPSGEKRTFEILTSPRPEFPYDEPLMFVL DAYRHGKPIAVSGRGLELLKSA
KVPTFNGTDAAANHGIYISSDVSNLASDFRKGIIIQRFWNRMALDHD AKKSPTSSH IKIED

CAT4 fehérje: 710 aa

MSNPHTSSSQPPITNVNTVVDNQGTQETTQFGTKVDTRDSL TAGERGPIIMEDFAFREKITHFGTIPERVVHA
RGFGVHGYFQPYKDWSELTC AKFLCDPNKKTVPVFRFSTVLGNRGSSDTVRDVRGFATRFYTEEGNFDLVGND
VAPFFVQDAIKFVDLIHA AKPEPNKDVPQAATAHNTAYDFFSRQPESIHTVLWALSGRGTPKSLRQVEGFGVH
TMRLINEQGKSVFVKFHWKPCQGLNCL EWDEAKKINGNDPDFHRNDMYTAIEKGHYPEYEFVQIIP EDEEDK
FEFDLLDSTKIVPESLVPVTP LGKMVLNRPDDFFGESEQVTFHVAHIVRGIGITDDPLLQGR LFSYTD TQIN
RMNSANYHQIPINRPITPVHNNNREGFMNFNVHKGAVSYYPNAMQNNKPEPVSPKGGYIEPPQRVNGIKQRG
KHGKKLEYFAQAQLFYNSLTTHEQQLLINNTRFELGKCTDLNVRQNFVTL LNHVDFNLAVRVANGIGVKAPEK
PANENKKQTSVGLSIENYKRPNHIAKTVAIIVAPGIDVNQASDMYKFLSNEGALVDYVGPTVGD FEGLPIKQ
TFLTSSSVLYDAVFVPNGEADAFYKMLEPCPAFPYGEPIQFIFD TYRHGKPLAVSGNATGLL KAAHPVYNSK
EDQEKGICTADDNLQ LKADFKAIIIQRFWARIPLDPAKESPTAASIVIEN

R. oryzae négy kataláz fehérjéjének aminosav sorrendje a bennük található motívumok jelölésével.

Kék: a monomerek polimerizációját irányító domén; **lila:** disztális hem kötő hely; **piros:** proximális hem kötőhely; **zöld:** NADPH kötőhely; **szürke:** peroxiszómális szignál peptid; **khaki:** extracelluláris leader peptid.

4. melléklet:

A BLAST keresés eredménye

	PDB ID		CAT1			CAT2			CAT3			CAT4			Hem	NADPH
			Max score	Query coverage	Max ident	Max score	Query coverage	Max ident	Max score	Query coverage	Max ident	Max score	Query coverage	Max ident		
1	3RGP_A	Bos taurus (cattle)	592	97%	60%	311	60%	39%	310	59%	40%	305	54%	42%	Hem b	-
2	7CAT_A	Bos taurus (cattle)	590	97%	60%	312	60%	39%	312	59%	40%	308	68%	38%	Hem b	+
3	3NWL_A	Bos taurus (cattle)	591	97%	60%	312	60%	39%	312	62%	39%	308	68%	38%	Hem b	+
4	1DGH_A	Human erythrocyte	586	97%	60%	309	54%	41%	302	61%	38%	305	54%	42%	Hem b	+
5	1DGG_A	Human erythrocyte	585	97%	60%	309	54%	41%	302	61%	38%	305	54%	42%	Hem b	+
6	1QQW_A	Human erythrocyte	586	97%	60%	310	54%	41%	302	61%	38%	305	54%	42%	Hem b	-
7	1DGH_B	Human erythrocyte	583	97%	59%	306	54%	41%	299	61%	38%	301	54%	41%	Hem b	+
8	1SI8_A	Enterococcus. faecalis	566	98%	58%	368	68%	41%	368	64%	42%	368	67%	42%	Hem b	-
9	2XQ1_A	Pichia angusta	537	99%	56%	300	63%	37%	300	60%	39%	300	64%	38%	Hem b	-
10	1QWL_A	Helicobacter pylori	537	97%	57%	352	68%	38%	339	65%	38%	352	64%	42%	Hem b	-
11	2A9E_A	Helicobacter pylori	533	97%	56%	349	68%	38%	335	65%	38%	348	64%	41%	Hem b	-
12	1H6N_A	Proteus mirabilis	515	99%	54%	325	66%	37%	342	64%	40%	330	66%	38%	Hem b	-
13	1M85_A	Proteus mirabilis	514	99%	54%	326	66%	37%	343	64%	40%	332	66%	39%	Hem b	-
14	2ISA_A	Vibrio salmonicida	513	97%	53%	317	62%	41%	320	60%	40%	315	60%	39%	Hem b	-
15	1E93_A	Proteus mirabilis	512	99%	54%	325	66%	37%	342	64%	40%	330	66%	38%	Hem b	-
16	3HB6_A	Proteus mirabilis	511	99%	54%	323	66%	37%	341	64%	40%	329	66%	38%	Hem b	-
17	1H7K_A	Proteus mirabilis	510	99%	54%	326	66%	37%	344	64%	40%	332	66%	39%	Hem b	-
18	1A4E_A	Saccharomyces cerevisiae	478	97%	52%	266	50%	39%	259	62%	34%	256	50%	39%	Hem b	-
19	2J2M_A	Exiguobacterium oxidotolerans	457	97%	48%	345	67%	40%	366	65%	42%	332	67%	38%	Hem b	-
20	1M7S_A	Pseudomonas syringae	437	97%	47%	339	65%	42%	336	63%	42%	321	65%	40%	Hem b	-
21	1GWH_A	Micrococcus luteus	431	97%	48%	284	52%	40%	284	52%	41%	293	56%	40%	Hem b	+
22	1HBZ_A	Micrococcus luteus	429	97%	48%	283	52%	40%	284	52%	41%	293	56%	40%	Hem b	-
23	1GWF_A	Micrococcus luteus	427	97%	48%	281	52%	40%	280	52%	41%	288	56%	40%	Hem b	-
24	3P9S_A	Escherichia coli K-12	389	79%	50%	598	95%	46%	590	91%	46%	598	93%	46%	Hem d	-
25	3P9R_A	Escherichia coli K-12	389	79%	50%	597	95%	45%	588	91%	46%	597	93%	46%	Hem d	-
26	1QF7_A	Escherichia coli	389	79%	50%	596	95%	45%	588	85%	47%	595	93%	46%	Hem b	-

	PDB ID		CAT1			CAT2			CAT3			CAT4			Hem	NADPH
			Max score	Query coverage	Max ident	Max score	Query coverage	Max ident	Max score	Query coverage	Max ident	Max score	Query coverage	Max ident		
27	3P9P_A	Escherichia coli K-12	389	79%	50%	600	95%	45%	592	85%	48%	598	93%	46%	Hem d	-
28	1IPH_A	Escherichia coli	389	79%	50%	599	95%	45%	591	85%	48%	598	93%	46%	Hem b	-
29	1CF9_A	Escherichia coli	388	79%	50%	597	95%	45%	590	85%	47%	596	93%	46%	Hem b	-
30	1P81_A	Escherichia coli	387	79%	50%	597	95%	45%	590	85%	47%	597	93%	46%	Hem d	-
31	1QWS_A	Escherichia coli	387	79%	50%	598	95%	45%	589	85%	47%	596	93%	46%	Hem b	-
32	1GGK_A	Escherichia coli	387	79%	50%	597	95%	45%	591	85%	48%	596	93%	46%	Hem b	-
33	1P7Z_A	Escherichia coli	386	79%	50%	597	95%	45%	588	85%	47%	596	93%	46%	Hem b	-
34	1P80_A	Escherichia coli	386	79%	50%	598	95%	45%	589	85%	47%	596	93%	46%	Hem b	-
35	1GG9_A	Escherichia coli	386	79%	50%	597	95%	45%	588	85%	47%	595	93%	46%	Hem b	-
36	1GGJ_A	Escherichia coli	386	79%	50%	597	95%	45%	591	85%	48%	596	93%	46%	Hem d	-
37	1P7Y_A	Escherichia coli	385	79%	50%	597	95%	45%	588	85%	47%	596	93%	46%	Hem b	-
38	3P9Q_A	Escherichia coli K-12	385	79%	50%	598	95%	45%	590	85%	48%	598	93%	46%	Hem d	-
39	1GGH_A	Escherichia coli	385	79%	50%	596	95%	45%	588	85%	47%	595	93%	46%	Hem b	-
40	3EJ6_A	Neurospora crassa	371	93%	44%	597	95%	45%	605	93%	47%	577	95%	43%	Hem b	-
41	1SY7_A	Neurospora crassa	355	93%	42%	579	92%	46%	567	92%	44%	563	93%	45%	Hem b	-
42	2XF2_A	Penicillium janthinellum	353	82%	46%	566	94%	45%	611	93%	47%	555	95%	43%	Hem d	-
43	2IUF_A	Penicillium vitale	352	82%	46%	566	94%	45%	608	93%	47%	553	95%	43%	Hem d	-

5. melléklet:

CAT2 fehérje modell templátokhoz való illeszkedése 0-100 skálán.

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer		
					lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	1	3P9S_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Bravo és mtsi. 1995.	2	1IPH_A	753	91,69	91,12	96,61	96,72	96,83	96,91	96,76	96,9	96,9
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	3	3P9Q_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	4	3P9P_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	5	1P80_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	6	1QWS_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	7	1P7Z_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	8	1GGK_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	9	1P80_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MateÅ és mtsi. 1999a.	10	1CF9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	11	3P9R_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	12	1GGJ_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	13	1P7Y_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	14	1GG9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MateÅ és mtsi. 1999a.	15	1QF7_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	16	1GGH_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2009.	17	3EJ6_A	688	97,94	93,83	99,7	99,7	99,66	99,7	99,7	99,7	99,7
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2004.	18	1SY7_A	715	94,69	96,41	98,71	98,71	98,71	98,67	98,71	98,71	98,71
<i>Penicillium janthinellum</i>	Borovik és mtsi. 2011.	19	2XF2_A	688	94,04	94,62	99,41	99,67	99,67	99,67	99,56	99,56	99,56
<i>Penicillium vitale</i>	Alfonso-Prieto és mtsi. 2007.	20	2IUF_A	688	93,85	92,53	99,26	99,67	99,67	99,67	99,56	99,56	99,56
<i>Enterococcus faecalis</i>	Frankenberg és mtsi. 2000.	21	1SI8_A	484	92,4	92,61	95,56	99,68	99,73	96,94	100	100	97,09
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004.	22	1QWL_A	505	91,64	99,18	95,92	99,79	99,69	95,21	99,79	99,79	95,62
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004.	23	2A9E_A	505	92,19	95,58	96,5	99,53	99,48	95,48	99,07	98,76	95,68
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	Hara és mtsi. 2007.	24	2J2M_A	491	93,54	97,3	95,62	99,69	99,74	97,18	98,65	99,27	91,56

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer		
					lán	+ hem	+loop modellezés	lán	+ hem	+loop modellezés	lán	+ hem	+loop modellezés
<i>Pseudomonas syringae</i>	Carpena és mtsi. 2003.	25	1M7S_A	484	92,14	100	92,14	99,79	99,9	91,67	99,58	99,74	92,6
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2001.	26	1H7K_A	483	93,35	97,68	90,52	98,73	98,1	90,52	98,73	99,15	91,15
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	27	1M85_A	484	93,05	97,05	89,89	98	97,89	90,68	99,36	99,15	91,78
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	28	1E93_A	484	92,84	97,89	91,36	97,68	97,63	90,63	98,89	98,73	91,47
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	29	1H6N_A	484	94,42	96	90,73	98,36	98,77	90,57	99,36	99,15	91,36
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2009.	30	3HB6_A	484	93,48	97,47	91,38	97,79	97,73	90,12	99,15	99,15	91,49
<i>Vibrio salmonicida</i>	Riise és mtsi. 2007.	31	2ISA_A	483	89,91	98,75	94,8	98,49	99,05	93,92	99,58	99,53	94,75
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Fita and Rossmann 1985.	32	7CAT_A	506	90,56	97,79	94,37	98,79	98,89	94,02	98,59	98,59	94,17
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Foroughi és mtsi. 2011.	33	3NWL_A	527	91,38	97,39	94,38	98,34	97,94	93,81	97,99	97,59	93,23
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Purwar és mtsi. 2011.	34	3RGP_A	499	90,98	96,59	94,18	98,52	98,49	94,38	98,59	97,44	87,12
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	35	1DGH_A	498	90,74	99,39	96,17	99,59	99,49	96,28	99,95	99,9	96,37
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	36	1DGG_A	497	90,94	99,19	96,37	99,79	99,69	96,38	99,69	99,79	96,93
<i>Human erythrocyte</i>	Ko és mtsi. 2000.	37	1QQW_A	527	90,38	99,19	95,79	99,59	99,59	95,24	100	99,95	95,64
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	38	1DGH_B	498	90,74	99,39	96,17	99,59	99,49	96,28	99,95	99,9	96,37
<i>Pichia angusta</i>	Penya-Soler és mtsi. 2011.	39	2XQ1_A	509	85,94	95,91	92,65	98,98	98,06	95,07	95,99	94,49	89,7
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	40	1GWH_A	503	95,38	96,18	92,57	99,14	99,59	95,18	99,19	99,59	96,58
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 1992.	41	1HBZ_A	753	92,97	95,89	92,36	98,94	99,19	95,23	99,39	98,99	96,88
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	42	1GWF_A	753	92,49	96,14	93,71	99,02	99,19	95,23	99,39	99,39	93,34
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MateÂ és mtsi. 1999b.	43	1A4E_A	753	96,1	99,18	94,67	99,08	99,23	94,05	99,38	99,38	94,31

Pirossal jelölve a „iterative_structural_align” modul által legnagyobb értéket kapott fehérjék, ezek felhasználásával végeztük a CAT1 fehérje homotetramer megszerkesztését.

PDB: fehérje pdb kódja, **Monomer: lán**c: hem jelenléte nélkül kapott monomer modell; **Monomer: lán**c + **hem**: hem jelenlétében kapott monomer modell, **Monomer: lán**c + **hem** + **loop modellezés**: hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott monomer modell; **Tetramer: lán**c: hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell, **Tetramer: lán**c + **hem**: hem jelenlétében kapott tetramer modell; **Tetramer: lán**c + **hem** + **loop modellezés**: hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell; **Tetramer** + **szimmetria: lán**c: hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel, **Tetramer** + **szimmetria: lán**c + **hem**: hem jelenlétében kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel; **Tetramer** + **szimmetria: lán**c + **hem** + **loop modellezés**: hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel.

CAT3 fehérje modell templátokhoz való illeszkedése 0-100 skálán.

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer		
					lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés
<i>Penicillium janthinellum</i>	Borovik és mtsi. 2011.	1	2XF2_A	688	94,33	94,33	97,38	97,96	97,81	97,76	97,96	97,81	97,74
<i>Penicillium vitale</i>	Alfonso-Prieto és mtsi. 2007.	2	2IUF_A	688	94,33	94,43	97,52	97,95	97,8	97,75	97,95	97,8	97,8
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2009.	3	3EJ6_A	688	94,12	97,65	97,65	97,61	97,65	97,61	97,65	97,65	97,65
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	4	3P9P_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	5	1GGJ_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Bravo és mtsi. 1995.	6	1IPH_A	753	92,61	95,68	97,49	92,61	95,68	97,49	92,61	95,68	97,49
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	7	1GGK_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	8	3P9Q_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MateÂ és mtsi. 1999a.	9	1CF9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	10	3P9S_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	11	1P80_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003	12	1QWS_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	13	1P80_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	14	1GG9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	15	1P7Z_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	16	1P7Y_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MateÂ és mtsi. 1999a.	17	1QF7_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli K-12</i>	Jha és mtsi. 2011.	18	3P9R_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	19	1GGH_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2004.	20	1SY7_A	715	90,54	90,54	93,69	97,09	96,99	96,56	97,92	96,99	96,99
<i>Enterococcus faecalis</i>	Frankenberg és mtsi. 2000.	21	1SI8_A	484	89,66	96,83	88,6	97,2	97,53	88,17	98,31	96,41	86,59
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	Hara és mtsi. 2007.	22	2J2M_A	491	93,12	91,66	91,66	97,58	97,96	93,79	94,42	75,62	27,54
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2001.	23	1H7K_A	483	86,73	87,57	88,84	95,94	96,68	89,41	95,78	94,52	90,25
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	24	1M85_A	484	89,26	91,36	89,26	97,10	96,83	88,05	94,73	94,52	89,47
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	25	1H6N_A	484	88	87,78	88,42	96,99	96,37	89,20	95,36	96	89,57
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	26	1E93_A	484	88,63	90,73	88,42	96,15	96,47	89,36	94,57	94,31	89,89
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2009.	27	3HB6_A	484	87,81	90,75	89,07	96,63	95,94	89,33	95,10	94,79	89,80
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004.	28	1QWL_A	505	92,05	93,48	94,09	97,55	97,49	93,37	96,74	76,74	92,51
<i>Pseudomonas syringae</i>	Carpena és mtsi. 2003.	29	1M7S_A	484	91,32	95,24	92,35	97,41	97,77	88,56	97,82	97,72	90,69
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004.	30	2A9E_A	505	93,01	94,25	94,04	97,35	96,96	93,93	97,63	96,91	92,85

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer		
					lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés
<i>Vibrio salmonicida</i>	Riise és mtsi. 2007.	31	2ISA_A	483	89,6	89,6	88,56	97,80	96,64	94,12	97,92	96,88	93,91
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Fita and Rossmann 1985.	32	7CAT_A	506	87,14	96,58	90,6	96,88	96,88	84,18	96,78	97,20	86,39
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Foroughi és mtsi. 2011.	33	3NWL_A	527	88,57	97,59	88,17	97,59	97,69	91,93	97,59	97,61	90,53
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Purwar és mtsi. 2011.	34	3RGP_A	499	87,57	97,59	84,36	97,24	97,59	89,77	97,59	97,74	94,03
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	35	1DGG_A	497	87,72	95,77	90,94	96,775	96,52	93,10	96,87	97,28	93,1
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	36	1DGH_A	498	87,32	96,17	92,15	96,67	96,32	92,60	96,88	97,08	94,56
<i>Human erythrocyte</i>	Ko és mtsi. 2000.	37	1QQW_A	527	96,37	95,19	92,58	96,04	96,94	92,73	95,39	97,39	93,88
<i>Pichia angusta</i>	Penya-Soler és mtsi. 2011.	38	2XQ1_A	509	90,02	90,02	88,97	97,09	96,93	90,05	86,43	86,9	77,01
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	39	1DGH_B	498	87,32	96,17	92,15	96,67	96,32	92,60	96,88	97,08	94,56
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	40	1GWH_A	503	85,54	89,15	86,34	96,73	96,63	89,55	96,58	96,18	87,54
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 1992.	41	1HBZ_A	498	87,75	90,16	83,33	96,18	96,48	89,60	96,58	95,18	89,80
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	42	1GWF_A	503	87,82	89,65	83,56	96,75	96,85	88,73	96,58	96,75	90,06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MateÂ és mtsi. 1999b.	43	1A4E_A	488	86,68	94,46	82,99	91,95	90,97	84,78	91,95	88,00	85,5

Pirossal jelölve a „iterative_structural_align” modul által legnagyobb értéket kapott fehérjék, ezek felhasználásával végeztük a CAT1 fehérje homotetramer megszerkesztését.

PDB: fehérje pdb kódja, **Monomer: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott monomer modell; **Monomer: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott monomer modell, **Monomer: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott monomer modell; **Tetramer: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell, **Tetramer: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott tetramer modell; **Tetramer: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell; **Tetramer + szimmetria: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel, **Tetramer + szimmetria: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel; **Tetramer + szimmetria: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel.

CAT4 fehérje modell templátokhoz való illeszkedése 0-100 skálán.

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer		
					lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	1	3P9S_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	2	3P9P_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	3	3P9Q_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Bravo és mtsi. 1995.	4	1IPH_A	753	90,84	90,56	96,9	97,285	97,25	97,28	97,39	97,18	97,32
<i>Escherichia coli</i> K-12	Jha és mtsi. 2011.	5	3P9R_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	6	1P80_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MateÅ és mtsi. 1999a.	7	1CF9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	8	1QWS_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	9	1GGK_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	10	1P7Z_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	11	1GGJ_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	12	1P7Y_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Chelikani és mtsi. 2003.	13	1P80_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MateÅ és mtsi. 1999a.	14	1QF7_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	15	1GG9_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Melik-Adamyan és mtsi. 2001.	16	1GGH_A	753	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2009.	17	3EJ6_A	688	94,12	92,56	99,41	99,41	99,37	99,41	99,33	99,41	99,41
<i>Neurospora crassa</i>	Díaz és mtsi. 2004.	18	1SY7_A	715	91,97	92,26	97,27	98,2425	98,09	98,16	98,13	98,13	98,13
<i>Penicillium janthinellum</i>	Borovik és mtsi. 2011.	19	2XF2_A	688	93,16	93,02	98,98	99,195	99,19	99,19	98,98	98,98	98,98
<i>Penicillium vitale</i>	Alfonso-Prieto és mtsi. 2007.	20	2IUF_A	688	93,26	92,67	98,97	98,6875	99,18	99,18	98,97	98,97	98,97
<i>Enterococcus. faecalis</i>	Frankenberg és mtsi. 2000.	21	1SI8_A	484	93,45	94,3	94,93	99,57	99,46	95,29	99,57	99,15	96,72
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004.	22	1QWL_A	505	90,63	94,7	96,53	99,07	98,97	94,90	99,18	99,13	95,92
<i>Helicobacter pylori</i>	Loewen és mtsi. 2004.	23	2A9E_A	505	90,55	93,01	94,86	98,96	98,97	93,99	98,25	97,94	95,27
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2001.	24	1H7K_A	483	91,57	92,84	96,21	97,94	97,86	95,255	97,89	97,68	95,36
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	Hara és mtsi. 2007.	25	2J2M_A	491	90,62	91,45	95,41	98,48	98,43	95,98	98,38	97,91	96,04
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	26	1M85_A	484	92,42	93,26	93,68	98,41	98,31	95,52	97,68	97,68	95,62
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	27	1H6N_A	484	89,89	96,21	92,84	98,25	98,20	96,47	97,89	97,89	97,41
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2003.	28	1E93_A	484	91,57	93,05	97,05	98,1	98,04	94,94	97,05	97,89	96,84
<i>Proteus mirabilis</i>	Andreoletti és mtsi. 2009.	29	3HB6_A	484	92,01	93,06	94,53	97,83	97,835	95,26	97,89	98,04	96,78
<i>Pseudomonas syringae</i>	Carpena és mtsi. 2003.	30	1M7S_A	484	91,11	89,66	96,28	98,44	98,65	98,34	98,96	98,34	97,92

			PDB ID	Hossza (aa)	Monomer			Tetramer			Tetramer		
					lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés	lánc	+ hem	+loop modellezés
<i>Vibrio salmonicida</i>	Riise és mtsi. 2007.	31	2ISA_A	483	91,06	94,17	95,01	99,42	99,58	98,33	99,31	99,58	98,38
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Fita and Rossmann 1985.	32	3NWL_A	527	89,57	89,97	94,58	98,54	98,64	97,89	98,79	98,59	97,08
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Foroughi és mtsi. 2011.	33	7CAT_A	506	91,16	90,96	96,18	98,29	98,38	94,48	98,59	98,59	97,38
<i>Bos taurus (cattle)</i>	Purwar és mtsi. 2011.	34	3RGP_A	499	90,78	90,98	96,79	98,54	98,68	97,49	98,59	98,59	97,24
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	35	1DGG_A	497	92,35	92,55	94,16	98,59	98,73	96,82	98,99	98,84	96,57
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	36	1DGH_A	498	93,56	91,14	96,57	98,64	98,68	96,47	97,98	97,83	95,82
<i>Human erythrocyte</i>	Ko és mtsi. 2000.	37	1QQW_A	527	92,18	91,78	94,98	98,49	98,48	95,08	97,84	98,14	73,30
<i>Human erythrocyte</i>	Putnam és mtsi. 2000.	38	1DGH_B	498	93,56	91,14	96,57	98,64	98,68	96,47	97,73	97,83	95,82
<i>Pichia angusta</i>	Penya-Soler és mtsi. 2011.	39	2XQ1_A	509	87,37	88,57	91,83	97,54	97,59	94,84	96,07	94,69	93,52
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	40	1GWH_A	503	93,87	91,56	97,79	98,94	99,14	98,69	99,19	99,39	98,89
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 1992.	41	1HBZ_A	498	94,57	91,76	97,79	99,09	99,09	98,99	99,19	99,19	99,19
<i>Micrococcus luteus</i>	Murshudov és mtsi. 2002.	42	1GWF_A	503	92,29	91,07	98,17	99,23	99,23	76,53	99,39	99,59	99,39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MateÂ és mtsi. 1999b.	43	1A4E_A	488	91,39	95,9	96,1	98,30	98,51	96,30	98,20	98,51	96,51

Pirossal jelölve a „iterative_structural_align” modul által legnagyobb értéket kapott fehérjék, ezek felhasználásával végeztük a CAT1 fehérje homotetramer megszerkesztését.

PDB: fehérje pdb kódja, **Monomer: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott monomer modell; **Monomer: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott monomer modell, **Monomer: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott monomer modell; **Tetramer: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell, **Tetramer: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott tetramer modell; **Tetramer: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell; **Tetramer + szimmetria: lánc:** hem jelenléte nélkül kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel, **Tetramer + szimmetria: lánc + hem:** hem jelenlétében kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel; **Tetramer + szimmetria: lánc + hem + loop modellezés:** hem jelenlétében loopmodellezéssel kapott tetramer modell szimmetria modellezéssel.